

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年3月4日 (04.03.2004)

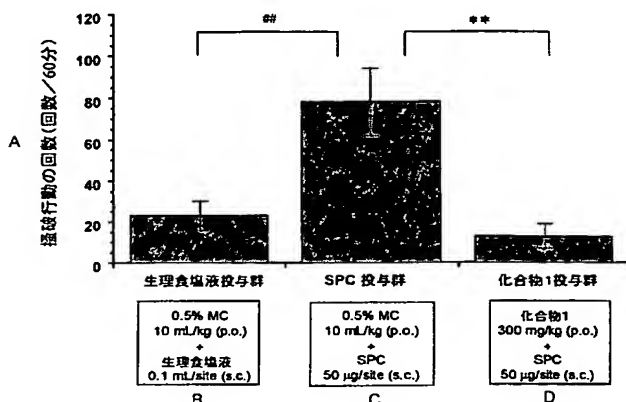
PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/017995 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/519, 31/55, 31/7088, 39/395, 48/00, A61P 17/04, 43/00, C07D 401/14, 403/06, 417/14, 471/14, 519/00
- (21) 国際出願番号: PCT/IB2003/003475
- (22) 国際出願日: 2003年8月22日 (22.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-241522 2002年8月22日 (22.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐木 真由美 (SAKI, Mayumi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 野中 裕美 (NONAKA, Hiromi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 宮地 宏昌 (MIYAJI, Hiromasa) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 (JP).
- [続葉有]

(54) Title: PREVENTIVE AND/OR THERAPEUTIC DRUGS FOR ITCH

(54) 発明の名称: 掻痒の予防および/または治療剤



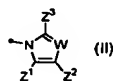
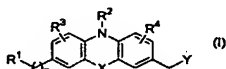
A...FREQUENCY OF SCRATCH (TIMES/60 min )

B...PHYSIOLOGICAL SALINE SOLUTION ADMINISTRATION GROUP  
0.5% MC (10 ml / kg (p.o.)) + PHYSIOLOGICAL SALINE SOLUTION (0.1 ml /SITE (s.c.))

C...SPC ADMINISTRATION GROUP  
0.5% MC (10 ml / kg (p.o.)) + SPC (50µg /SITE (s.c.))

D...COMPOUND 1 ADMINISTRATION GROUP  
COMPOUND 1 (300 mg / kg (p.o.)) + SPC (50µg /SITE (s.c.))

(57) Abstract: Preventive and/or therapeutic drugs for itch containing as the active ingredient substances capable of suppressing the functions of GPR4 relating to signal transduction; and nitrogen-containing tricyclic compounds represented by the general formula (I), quaternary ammonium salts thereof, or pharmacologically acceptable salts of both: (I) wherein R<sup>1</sup> is substituted or unsubstituted lower alkyl or the like; R<sup>2</sup> is hydrogen, substituted or unsubstituted lower alkyl, or the like; R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are each independently hydrogen, lower alkyl, or the like; n is 0 or 1; X is -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- or the like; and Y is a group represented by the general formula (II): (II) (wherein W is CH or nitrogen; Z<sup>1</sup> and Z<sup>2</sup> are each independently hydrogen, substituted or unsubstituted lower alkyl, or the like; and Z<sup>3</sup> is hydrogen, substituted or unsubstituted lower alkyl, or the like).



[続葉有]



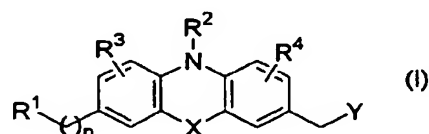
和醱酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 市川 俊司 (ICHIKAWA, Shunji) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醱酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 高嶋 智恵美 (TAKASHIMA, Chiemi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醱酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 松村 務 (MATSUMURA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒590-8554 大阪府 堺市 高須町一丁 1 番 5 3 号 協和醱酵工業株式会社 堺研究所内 Osaka (JP). 新井 仁 (ARAI, Hitoshi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醱酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 佐々木 克敏 (SASAKI, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都 町田市 旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醱酵工業

株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 小畑 長英 (KOBATAKE, Choei) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都 千代田区 大手町一丁目 6 番 1 号 協和醱酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP). 九十九 透仁 (TSUKUMO, Yukihito) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醱酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 飯田 恭一郎 (IIIDA, Kyoichiro) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醱酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 窪山 剛之 (KUBOYAMA, Takeshi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長泉町下土狩 1 1 8 8 協和醱酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 真部 治彦 (MANABE, Haruhiko) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県 駿東郡 長

[続葉有]

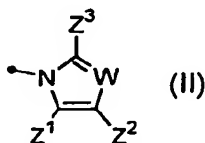
(57) 要約:

GPR4 のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤を提供する。また、式 (I)



[式中、R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換の低級アルキル等を表し、R<sup>2</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル等を表し、R<sup>3</sup>および R<sup>4</sup>は同一または異なって水素、低級アルキル等を表し、nは0または1を表し、Xは-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-等を表し、

Yは式 (II)



(式中、WはCHまたは窒素原子を表し、Z<sup>1</sup>および Z<sup>2</sup>は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル等を表し、Z<sup>3</sup>は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル等を表す)を表す]で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を提供する。



泉町下土狩 1 1 8 8 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).

AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 掻痒の予防および／または治療剤

技術分野

本発明は、GPR4 のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤に関する。また、本発明は、掻痒の予防および／または治療剤として有用な含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩に関する。さらに、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) が誘発する掻破行動の回数の減少を指標とした掻痒治療剤のスクリーニング法に関する。

背景技術

痒みは炎症性皮膚疾患をはじめとする多くの皮膚疾患において重要な症状であり、掻破行動を誘起して皮膚症状を悪化させる。また、内科的全身疾患の中にも慢性腎不全、糖尿病等の痒みを伴うものがある。代表的な掻痒性皮膚疾患の一つである蕁麻疹の痒みが、主にヒスタミンによって生じることが知られているが、それ以外の痒みの発生機序は明らかにされていない。治療には、抗アレルギー薬、抗ヒスタミン剤、ステロイド外用剤が用いられているが、すべての掻痒に有効とはいえない。また、ステロイド外用剤の長期使用は副作用を伴うことから、さらに優れた掻痒の予防または治療剤が求められている。

一方、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、GPCR と略す）である GPR4 はスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC)、リゾホスファチジルコリン (LPC) を内在性リガンドとする受容体である [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、276 巻、41325-41335 頁 (2001 年)]。SPC については、ヒト表皮角化細胞において ICAM-1 発現、TNF- $\alpha$  産生を誘導すること [ジャーナル・オブ・インベスティゲイティブ・ダーマトロジー (J. Invest. Dermatol.)、112 巻、91-96 頁 (1999 年)]、トランスグルタミナーゼ活性を増強することからアトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚炎で見られる皮膚の角化、炎症・アレルギー反応に関与していることが示唆されている [ジャーナル・オブ・リピッド・リサーチ (J. Lipid Res.)、42 巻、1562-1570 頁 (2001 年)]。さらに、アトピー性皮膚炎患者の角層では、健常人



に比べ、SPC を産生する酵素活性が増強するため、SPC の蓄積が見られる [ジャーナル・オブ・インベスティゲイティブ・ダーマトロジー (J. Invest. Dermatol.)、106 巻、1242-1249 頁 (1996 年)]。また、SPC による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を抑制する生薬成分がアトピー性皮膚炎に効果があることも報告されている (特開平 9-124500)。しかし、SPC の掻痒への直接関与を示す報告はない。Kuraishi らは compound 48/80 または substance P をマウスの皮下に投与すると掻破行動が誘発されることを報告した [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ファルマコロジー (Eur. J. Pharmacol.)、275 巻、229-233 頁 (1995 年)]。その後、掻破行動は掻痒の動物モデルとして用いられているが、SPC が掻破行動を誘発するという報告もない。

GPR4 のもう一つのリガンドである LPC は乾癬の病変部で蓄積し [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ファルマコロジー (Br. J. Pharmacol.)、134 巻、398-402 頁 (1995 年)]、ヒトに皮内投与することにより、浮腫、紅斑、細胞浸潤を誘導する [アクタ・デルマト・ベネレオロジカ (Acta. Derm. Venereol.)、80 巻、242-246 頁 (2000 年)] ことから、皮膚炎への関与が示唆されている。SPC、LPC とも GPR4 以外に、OGR-1 [ネイチャー・セル・バイオロジー (Nat. Cell Biol.)、2 巻、261-267 頁 (2000 年)]、G2A [サイエンス (Science)、293 巻、702-705 頁 (2001 年)] の各受容体に結合し、シグナル伝達を誘導することが報告されているが、各受容体の作用はいまだ解明されていない。

W002/24222 には GPR4 拮抗剤をアトピー性皮膚炎の治療に用いることが文言上開示されている。

掻痒を引き起こす疾患は多岐に及ぶことが知られており、該疾患としては、種々の皮膚疾患 (アトピー性皮膚炎、湿疹・皮膚炎、蕁麻疹、痒疹、乾皮症、虫刺症、疥癬、真菌症、皮膚掻痒症、肥厚性癬痕、乾癬、水疱症、薬疹等)、肝・胆道疾患 (原発性胆汁性肝硬変、胆汁うっ滞症、肝硬変等)、腎疾患 (慢性腎不全等)、内分泌・代謝疾患 (糖尿病、甲状腺機能異常等)、血液疾患 (真性多血症、鉄欠乏性貧血等)、悪性腫瘍 (悪性リンパ腫、消化器癌等)、神経疾患 (多発性硬化症、神経症等)、A I D S 等が挙げられる。また妊娠、薬剤等によって掻痒が引き起こされる場合もある (「医薬ジャーナル」(医

薬ジャーナル社)、37巻、第11号(平成13年11月1日発行)、73~77及び79~82頁)。

GPCRには、細胞内で過剰に発現すると、リガンドが存在しなくてもシグナルを流す、構成活性型 GPCR と呼ばれる GPCR が知られている。リガンド非存在時に流れるシグナルは構成的活性と呼ばれる。構成活性型 GPCR には、天然に存在するものと、アミノ酸の置換、欠失などの変異を導入することにより造成された変異 GPCR [モレキュラー・ファルマコロジー (Mol. Pharmacol.)、57巻、890頁(2000年)、W098/46995]がある。GPCRの構成的活性を抑制するアンタゴニストはインバーサアゴニストと呼ばれる。

文献[ブレチン・デ・ラ・ソシエテ・シミック (Bulletin de la Societe Chimique)、185頁(1981年)およびヨーロッパ・ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (Eur. J. Med. Chem.)、12巻、219頁(1977年)]に、後述の式(I)において  $R^1$  がモルホリノを表し、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が水素を表し、Yに相当する置換基がモルホリノであり、nが1であり、Xが $-(CH_2)_2-$ を表す化合物が開示されている。

#### 発明の開示

本発明の目的は、

- 1) GPR4 のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する掻痒の予防および/または治療剤を提供すること、
- 2) 掻痒の予防および/もしくは治療作用、または GPR4 のシグナル伝達に関する機能の抑制作用を有する含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を提供すること、
- 3) 含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する掻痒の予防および/または治療剤を提供すること、ならびに
- 4) 含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理的に許容される塩を有効成分として含有する GPR4 のシグナル伝達に関する機能の抑制剤を提供することである。

また、本発明の別の目的は、SPC誘発搔破行動の回数の減少を指標にした掻痒治療剤のスクリーニング法を提供することである。

本発明は、以下の（１）～（２２）に関する。

（１）配列番号１１記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

（２）以下の１）～４）

１）配列番号１２記載の塩基配列から選ばれる連続した５～６０塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

２）配列番号１４記載の塩基配列から選ばれる連続した５～６０塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

３）配列番号１８記載の塩基配列から選ばれる連続した５～６０塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

４）配列番号１２、１４および１８から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号１１記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する５～６０塩基からなるオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

のいずれかを一つを有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

（３）以下の１）～４）

１）配列番号１１記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

２）配列番号１３記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

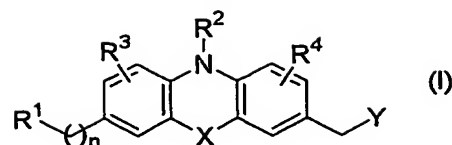
３）配列番号１７記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

４）配列番号１１、１３および１７から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号１１記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質を認識する抗体、

のいずれかを一つを有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療

剤。

(4) 式 (I)



[式中、 $R^1$ は置換もしくは非置換の複素環基、 $-NR^5R^6$  (式中、 $R^5$ および $R^6$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $R^5$ および $R^6$ が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)、 $-OR^7$  (式中、 $R^7$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)、 $-SR^{7a}$  (式中、 $R^{7a}$ は前記 $R^7$ と同義である)、 $-CONR^{5a}R^{6a}$  (式中、 $R^{5a}$ および $R^{6a}$ はそれぞれ前記 $R^5$ および前記 $R^6$ と同義である)、 $-CO_2R^{7b}$  (式中、 $R^{7b}$ は前記 $R^7$ と同義である)、 $-N^+R^{5b}R^{6b}R^8$  (式中、 $R^{5b}$ および $R^{6b}$ はそれぞれ前記 $R^5$ および前記 $R^6$ と同義であり、 $R^8$ は低級アルキル、低級アルケニル、またはアラルキルを表す)、ホルミル、カルボキシ、またはシアノを表し、

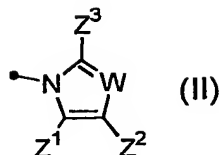
$R^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表し、

$R^3$ および $R^4$ は同一または異なって水素、低級アルキル、またはハロゲンを表し、

$n$ は0または1を表し、

X は  $-(CH_2)_2-$  または  $-CH=CH-$  を表し、

Y は式 (II)



(式中、W は CH または窒素原子を表し、

$Z^1$  および  $Z^2$  は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $Z^1$  および  $Z^2$  がそれぞれ隣接する 2 つの炭素原子と一緒にになって置換もしくは非置換の芳香環または置換もしくは非置換の複素環を形成し、

$Z^3$  は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す) を表す] で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

(5)  $R^1$  が  $-NR^5R^6$  であり、 $R^5$  および  $R^6$  が隣接する窒素原子と一緒にになって置換もしくは非置換の複素環基を形成する第 (4) 項に記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

(6)  $R^2$  が水素である第 (4) 項または第 (5) 項に記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

(7)  $R^3$  および  $R^4$  が水素である第 (4) 項～第 (6) 項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬

理学的に許容される塩。

(8)  $Z^1$  および  $Z^2$  がそれぞれ隣接する 2 つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成する第(4)項～第(7)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

(9) 第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

(10) 第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

(11) 第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能の抑制剤。

(12) 以下の 1) ～ 4)

1) ヒトを除く哺乳類動物にスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を皮下および皮内投与することによりヒトを除く哺乳類動物における掻破行動を誘発する工程、

2) 試験化合物存在下または非存在下での SPC により誘発されたヒトを除く哺乳類動物における掻破行動の回数を測定する工程、

3) 試験化合物存在下と試験化合物非存在下での SPC により誘発されたヒトを除く哺乳類動物における掻破行動の回数を比較する工程、および

4) 試験化合物から SPC により誘発された掻破行動の回数を減少させる物質を選択する工程、

を含む掻痒治療剤のスクリーニング法。

(13) 第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、掻痒の予防および／または治療方法。

(14) 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための第(4)項～第(8)

項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

(15) 掻痒が皮膚疾患、肝・胆道疾患、腎疾患、内分泌・代謝疾患、血液疾患、悪性腫瘍、神経疾患およびAIDSから選択される疾患に伴う掻痒である第(1)～(3)項および第(10)項のいずれかに記載の掻痒の予防および／または治療剤。

(16) 掻痒が皮膚疾患に伴う掻痒であり、該皮膚疾患がアトピー性皮膚炎、湿疹・皮膚炎、蕁麻疹、痒疹、乾皮症、虫刺症、疥癬、真菌症、皮膚掻痒症、肥厚性癬痕、乾癬、水疱症および薬疹から選択される皮膚疾患である第(15)項記載の掻痒の予防および／または治療剤。

(17) 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の治療有効量を投与することを特徴とする、掻痒の予防および／または治療方法。

(18) 第(2)項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の治療有効量を投与することを特徴とする、掻痒の予防および／または治療方法。

(19) 第(3)項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の治療有効量を投与することを特徴とする、掻痒の予防および／または治療方法。

(20) 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の使用。

(21) 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための、第(2)項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の使用。

(22) 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための第(3)項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の使用。

本発明者らは、GPCRであるGPR4の有するシグナル伝達に関する機能を抑制する物質が、掻痒の予防および／または治療に有効であるとの新知見を見出し、本発明を完成するに至った。また、本発明者らは、構成活性型のGPCRであるGPR4の構成的活性を抑制する物質の探索を行い、GPR4の構成的

活性を抑制する物質が、掻痒の予防および／または治療に有効であることを見い出した。

GPR4 の有するシグナル伝達に関する機能を抑制する物質としては、GPR4 自身の発現を阻害または抑制する物質、リガンドの GPR4 への結合を阻害する物質、GPR4 へのリガンド結合により生ずるシグナル伝達[例えば、細胞内 cAMP 濃度の変化（上昇または低下）、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化（上昇）、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼのリン酸化等が含まれる]を抑制する物質、GPR4 の構成的活性により生ずるシグナル伝達を抑制する物質（例えば GPR4 のインバースアゴニスト等が含まれる）等が含まれる。上記物質は、これら機能を有する物質であれば、その構造は特に限定されず、公知の構造を有するものでもよい。GPR4 としては、例えば配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質等が挙げられる。

配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有し、かつ配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質は、文献 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989 年) (以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997 年) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) 等] 記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 11、13 および 17 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。



欠失、置換または付加したアミノ酸の数は特に限定されないが、1個～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加したとは、該アミノ酸配列中の任意かつ1もしくは複数の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換または付加があることを意味し、欠失、置換または付加が同時に生じてもよく、欠失、置換または付加されるアミノ酸残基については、天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリンおよびL-システインの各残基等が挙げられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、tert-ブチルグリシン、tert-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

また、配列番号11、13および17から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換または付加したアミノ酸配列を有する蛋白質が、配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する

蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有するには、そのアミノ酸配列と配列番号 11 記載のアミノ酸配列とが、少なくとも 75% 以上、通常は 80% 以上、好ましくは 90% 以上、さらには 95% 以上の同一性を有していることが好ましい。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST[Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)]や FASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズム BLAST に基づいて、BLASTN (塩基対塩基データベース) や BLASTX (塩基対アミノ酸データベース) とよばれるプログラムが開発されている [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)]。BLAST に基づいた BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score=100、wordlength=12 とする。また、BLAST に基づいて BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば score=50、wordlength=3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる [Gapped BLAST については文献 (Nuc. Acids Res., 25, 3389-3402 (1997)) を参照]。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 参照)。

GPR4 自身の発現を阻害または抑制する物質としては、例えば、配列番号 12、14 および 18 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列から選ばれる連続した 15～60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチド (以下、アンチセンス・オリゴヌクレオチドともいう)、配列番号 12、14 および 18 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制するオリゴヌクレオチド、これらのオリゴヌクレオチドの誘導体 (以下、オリゴヌクレオチド誘導体という) 等が挙げられる。

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドとしては、配列番号 12、14 および 18 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列から選ばれる連続した 15～60 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドであれば特に限定されないが、好ましくは

17～60塩基、より好ましくは20～60塩基、さらに好ましくは30～60塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが挙げられる。特に好ましくは上記オリゴヌクレオチドの翻訳開始領域の相補的配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチドが挙げられる。該アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、配列番号12、14および18から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列またはその断片の塩基配列に関する情報に基づき、常法により、例えばDNA合成機を用いることにより調製することができる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステルとの結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾリルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等を挙げることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド誘導体を用い、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕、トリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕、リボザイム技術〔Current Opinion in Chemical Biology, 3, 274 (1999)、FEMS Microbiology Reviews, 23, 257

(1999)、Frontiers in Bioscience, 4, D497 (1999)、Chemistry & Biology, 6, R33 (1999)、Nucleic Acids Research, 26, 5237 (1998)、Trends in Biotechnology, 16, 438 (1998)]、あるいはデコイ DNA 法 [Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 56, 563 (1998)、Circulation Research, 82, 1023 (1998)、Experimental Nephrology, 5, 429 (1997)、Nippon Rinsho - Japanese Journal of Clinical Medicine, 54, 2583 (1996)] に準じて、GPR4 自身の発現を阻害または抑制することができる。

配列番号 1 2、1 4 および 1 8 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドとは、配列番号 1 2、1 4 および 1 8 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA の一部、または全部をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7 ~ 1.0 mol/l の塩化ナトリウム存在下、65 °C でハイブリダイゼーションを行った後、0.1 ~ 2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mmol/l 塩化ナトリウム、15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65 °C 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA 等を挙げるができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズするヌクレオチドとしては、例えば上記 BLAST や FASTA 等を用いて計算したときに 1 2、1 4 および 1 8 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA の相補的配列を有する DNA と少なくとも 75 % 以上の相同性を有する DNA が好ましく、より好ましくは 80 % 以上の相同性を有する DNA、さらに好ましくは 95 % 以上の相同性を有する DNA を挙げるができる。ヌクレオチドとしては、DNA、RNA 等いずれも用いられるが DNA が好適に用いられる。

上記アンチセンス・オリゴヌクレオチドもしくは該アンチセンス・オリゴ

ヌクレオチド誘導体、または配列番号 1 2、1 4 および 1 8 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチドもしくは該ヌクレオチド誘導体を単独でまたはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデノウィルスアソシエーテッドウィルスベクター等の遺伝子治療用ベクターに挿入した後、下記に記載した常法に従って製剤化したものを掻痒の予防および／または治療剤として使用することもできる。

遺伝子治療用ベクターを該予防および／または治療剤として用いる場合には、該遺伝子治療用ベクターと遺伝子治療剤に用いる基剤を調合することにより製造することができる [Nature Genet., 8, 42 (1994)]。

上記基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、例えば蒸留水、塩化ナトリウムまたは塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、乳糖、デキストラン、ブドウ糖等の糖溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液または塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等が挙げられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油またはレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液または分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

該予防および／または治療剤は、液体の場合はそのまま、固体の場合は、投与直前に、必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して使用することができる。

投与方法としては、例えば患者の治療部位に吸収されるように、局所的に投与する方法を挙げることができる。また、非ウイルス遺伝子移入法によっても目的とする治療部位に DNA を輸送することができる。

非ウイルス遺伝子移入法としては、リン酸カルシウム共沈法 [Virology, 52, 456-467 (1973); Science, 209, 1414-1422 (1980)]、マイクロインジェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5399-5403 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7380-7384 (1980); Cell, 27, 223-231 (1981); Nature, 294, 92-94 (1981)]、リポソームを介した膜融合-介在移入法 [Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7417 (1987); Biochemistry, 28, 9508-9514 (1989); J. Biol. Chem., 264, 12126-12129 (1989); Hum. Gene Ther., 3, 267-275 (1992); Science, 249, 1285-1288 (1990); Circulation, 83, 2007-2011 (1992)]、直接 DNA 取り込みまたは受容体-媒介 DNA 移入法 [Science, 247, 1465-1468 (1990); J. Biol. Chem., 266, 14338-14342 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655-3659 (1991); J. Biol. Chem., 264, 16985-16987 (1989); BioTechniques, 11, 474-485 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410-3414 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255-4259 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033-4037 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8850-8854 (1991); Hum. Gene Ther., 3, 147-154 (1991)] 等を挙げることができる。

リガンドの GPR4 への結合を阻害する物質としては、例えば GPR4 を認識する抗体、GPR4 に拮抗作用を有する化合物等を挙げることができる。

上記抗体としては、GPR4 を認識する抗体であればいずれも用いることができるが、GPR4 を特異的に認識する抗体が好ましい。また該抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。このような抗体として、例えば、GPR4 を認識する中和抗体等をあげることができる。また、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体等も本発明の抗体として用いることができる。

上記抗体は、例えば、以下の方法に準じて調製することができる。

#### (1) ポリクローナル抗体の作製

GPR4 またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは GPR4 の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物としては、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物 1 匹当たり 50~100  $\mu$ g が好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1 回目の投与の後 1～2 週間おきに 3～10 回行う。各投与後、3～7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA 法): 医学書院刊 (1976 年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、または DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A または G-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独でまたは組み合わせて処理する方法が挙げられる。

## (2) モノクローナル抗体の作製

### (a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた GPR4 またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは GPR4 の一部のアミノ酸配列を有するペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後 3～7 日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓を MEM 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1～2 分間処理し赤血球を除去した後、MEM 培地で 3 回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

### (b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c 由来) 骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1 (以下、P3-U1 と略す) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81,

1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640 培地にグルタミン (1.5mmol/l)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$ mol/l)、ジェンタマイシン ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) および牛胎児血清 (FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに 8-アザグアニン ( $15 \mu\text{g/ml}$ ) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の 3~4 日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を  $2 \times 10^7$  個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞を MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1 リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = 5~10 : 1 になるよう混合し、1,200rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 $10^8$  抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を 0.2~1ml 添加し、さらに 1~2 分間毎に MEM 培地 1~2ml を数回添加する。

添加後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるように調製する。該調製液を 900rpm で 5 分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地 [正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4}$ mol/l)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$ mol/l) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$ mol/l) を加えた培地] 100ml 中に懸濁する。

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに  $100 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、37℃で 7~14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。



酵素免疫測定法の具体例として、以下の方法を挙げることができる。

免疫の際、抗原に用いた GPR4 またはその部分断片ポリペプチドの精製標品、あるいは GPR4 の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウス IgM グロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行い、抗原に用いたポリペプチドに特異的に反応するものを本発明で用いられるモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返す [1 回目は、HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを本発明で用いられるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株として選択する。

#### (d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する] した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、(c) で取得した本発明で用いられるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpm で 5 分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。ポリペプチド量は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出する。

上記、GPR4 を認識する抗体を含有する掻痒の予防および/または治療剤は以下のように調製することができる。

該抗体を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与するこ

とも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または静脈内投与等の非経口投与を挙げることができる。投与形態としては、錠剤、注射剤等が挙げられる。

経口投与に適当な製剤としては、錠剤等が挙げられる。錠剤等は、乳糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤等が挙げられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液または両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。また、非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  ~  $8 \text{mg}/\text{kg}$  である。

GPR4 の構成的活性により生じるシグナル伝達に関する機能を抑制する物質は、該構成的活性により生ずるシグナル伝達を抑制することのできる物質を探索することによっても取得することができる。

GPR4 に拮抗作用を有する化合物としては、例えば、式 (I) で表される化合物が挙げられる。以下、式 (I) で表される化合物を化合物 (I) という。他の式番号の化合物についても同様である。

化合物 (I) の各基の定義において、以下の例示が挙げられる。

- (i) 低級アルキルおよび低級アルカノイルの低級アルキル部分としては、例えば直鎖または分岐状の炭素数 1 ～ 10 のアルキルが挙げられ、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、イソオクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。
- (ii) シクロアルキルとしては、例えば炭素数 3 ～ 8 のシクロアルキルが挙げられ、具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等が挙げられる。
- (iii) 低級アルケニルとしては、例えば直鎖、分岐または環状の炭素数 2 ～ 8 のアルケニルが挙げられ、具体的にはビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、シクロヘキセニル、2, 6-オクタジエニル等が挙げられる。
- (iv) 低級アルキニルとしては、例えば直鎖または分岐状の炭素数 2 ～ 8 のアルキニルが挙げられ、具体的にはエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル等が挙げられる。
- (v) ハロゲン、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素の各原子を表す。
- (vi) アリールおよびそれぞれが隣接する 2 つの炭素原子と一緒に形成される芳香環から水素原子を一つ除いた基としては、例えば炭素数 6 ～ 14 の単環性、二環性または三環式のアリールが挙げられ、具体的にはフェニル、ナフチル、インデニル、アントラニル等が挙げられる。
- (vii) アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分は、前記の低級アルキル(i)の定義から水素原子を一つ除いたものと同義である。
- (viii) アラルキルのアリール部分としては、前記アリール(vi)の定義で挙げた基に加え、例えば前記アリールがシクロアルキルと縮合した二環性縮合環基が挙げられ、具体的にはインダニル、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチル、6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-5H-ベンゾシクロヘプチル等が挙げられる。
- (ix) 複素環基および複素環アルキルの複素環基部分ならびにそれぞれが隣接する 2 つの炭素原子と一緒に形成される複素環から水素原子を一つ除いた基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれ

る少なくとも1個の原子を含む5員または6員の単環性複素環基、3～8員の環が縮合した二環または三環式であって窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む縮環性複素環基等が挙げられ、具体的にはピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ベンゾイミダゾリル、2-オキソベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、プリニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾジオキサリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、キノリル、イソキノリル、フタラジニル、ナフチルリジニル、キノキサリニル、ピロリル、ピラゾリル、キナゾリニル、シンノリニル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チエニル、フリル、ピロリジニル、2, 5-ジオキソピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジル、ピペリジノ、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ホモピペリジル、ホモピペリジノ、モルホリニル、モルホリノ、チオモルホリニル、チオモルホリノ、ピラニル、テトラヒドロピリジル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、インドリニル等が挙げられる。

(x)隣接する窒素原子と一緒に形成される複素環基としては、例えば少なくとも1個の窒素原子を含む5員または6員の単環性複素環基(該単環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい)、3～8員の環が縮合した二環または三環式で少なくとも1個の窒素原子を含む縮環性複素環基(該縮環性複素環基は、他の窒素原子、酸素原子または硫黄原子を含んでいてもよい)等が挙げられ、具体的にはピリジル、テトラヒドロピリジル、インドリニル、イソインドリニル、ピロリジニル、チアゾリジニル、オキサゾリジニル、ピペリジノ、ホモピペリジノ、ピペラジニル、ホモピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、ペルヒドロアゼピニル、ペルヒドロアゾシニル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、オクタヒドロキノリル、ベンゾイミダゾリル、インダゾリル、インドリル、イソインドリル、プリニル、ジヒドロインドリル、ピロリル、ジヒドロピロリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル等が挙げら

れる。

(xi) 置換低級アルキルおよび置換低級アルカノイルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数 1～3 の、シクロアルキル、低級アルカノイル、低級アルコキシ、アリールオキシ、置換アリールオキシ〔該置換アリールオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数 1～3 の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等が挙げられる。ここで低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕、アラルキルオキシ、置換アラルキルオキシ〔該置換アラルキルオキシにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数 1～3 の、低級アルキル、低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ等が挙げられる。ここで低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義であり、低級アルコキシおよび低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、低級アルキルチオ、置換低級アルキル〔該置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数 1～3 のヒドロキシ、ハロゲン等が挙げられる〕、置換低級アルカノイル〔該置換低級アルカノイルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数 1～3 のハロゲン等が挙げられる〕、モノまたはジ低級アルキルアミノ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノ、低級アルカノイルアミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニル、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシ、複素環基等が挙げられる。

ここで示したアリールオキシおよびアラルキルオキシのアリール部分、シクロアルキル、ハロゲン、複素環基、ならびに低級アルカノイル、低級アルコキシ、低級アルカノイルオキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキ

ルチオ、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルフィニル、低級アルコキシカルボニルアミノおよび低級アルカノイルアミノの低級アルキル部分は、それぞれ前記アリール(vi)、シクロアルキル(ii)、ハロゲン(v)、複素環基(ix)、および低級アルキル(i)と同義であり、アラルキルオキシのアルキレン部分は、前記低級アルキル(i)から水素原子を一つ除いたものと同義である。

モノまたはジ低級アルキルアミノ、モノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルおよびモノまたはジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの低級アルキル部分は、それぞれ前記低級アルキル(i)と同義であり、ジ低級アルキルアミノ、ジ低級アルキルアミノカルボニルおよびジ低級アルキルアミノカルボニルオキシの2つの低級アルキル部分は、それぞれ同一でも異なってもよい。

(xii)置換アリール、置換アラルキル、置換シクロアルキル、置換低級アルケニル、置換低級アルキニル、置換複素環基、置換複素環アルキル、隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基、それぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される置換芳香環およびそれぞれが隣接する2つの炭素原子と一緒に形成される置換複素環における置換基としては、前記置換低級アルキルにおける置換基(xi)の定義で挙げた基に加え、低級アルキル、アリール、置換アリール、アラルキル、置換アラルキル、複素環基、置換複素環基、複素環アルキル、置換複素環アルキル等が挙げられる。さらに、置換アリールおよび隣接する窒素原子と一緒に形成される置換複素環基における置換基は低級アルキル〔該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である〕または置換低級アルキル〔該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義であり、該置換低級アルキルにおける置換基としては、同一または異なって、例えば置換基数1~3の、ハロゲン、ヒドロキシ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル等が挙げられる。ここでハロゲンは前記ハロゲン(V)と同義であり、低級アルコキシカルボニルの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕であつてもよい。

ここで示した低級アルキル、アリール、複素環基および複素環アルキルの複素環基部分、アラルキルおよび複素環アルキルのアルキレン部分ならびに

アラルキルのアリアル部分は、それぞれ前記低級アルキル(i)、アリアル(vi)、複素環基(ix)、アラルキルのアルキレン部分(vii)およびアラルキルのアリアル部分(viii)と同義である。また、置換アリアル、置換アラルキル、置換複素環基、置換複素環アルキルにおける置換基としては、同一または異なっており、例えば置換基数1～3の、低級アルキル〔該低級アルキルは前記低級アルキル(i)と同義である〕、低級アルコキシ〔該低級アルコキシの低級アルキル部分は前記低級アルキル(i)と同義である〕、ハロゲン〔該ハロゲンは前記ハロゲン(v)と同義である〕等が挙げられる。

化合物(I)の四級アンモニウム塩としては、化合物(I)の塩基性部位にハロゲン化低級アルキル(該低級アルキルおよび該ハロゲンはそれぞれ前記と同義である)、ハロゲン化アラルキル(該ハロゲンおよび該アラルキルはそれぞれ前記と同義である)、ヒドロキシ低級アルキル(該低級アルキルは前記と同義である)等が付加した四級アンモニウム塩であれば特に限定されないが、例えばジメチルアミノ基を有する化合物(I)にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピペリジノ基を有する化合物(I)にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピロリジノ基を有する化合物(I)にヨウ化メチルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、モルホリノ基を有する化合物(I)に臭化ベンジルを作用させて得られる四級アンモニウム塩、ピロリジノ基を有する化合物(I)にヨウ化エチルを反応させて得られる四級アンモニウム塩においてヨウ化物イオンと水酸化物イオンが交換されて得られる四級アンモニウム塩等が挙げられる。

化合物(I)の薬理学的に許容される塩としては、毒性のない、水溶性のものが好ましく、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、酒石酸塩等の有機酸塩等の酸付加塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等の金属塩、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム等のアンモニウム塩、モルホリン付加塩、ピペリジン付加塩等の有機アミン付加塩、またはグリシン付加塩、フェニルアラニン付加塩、リジ

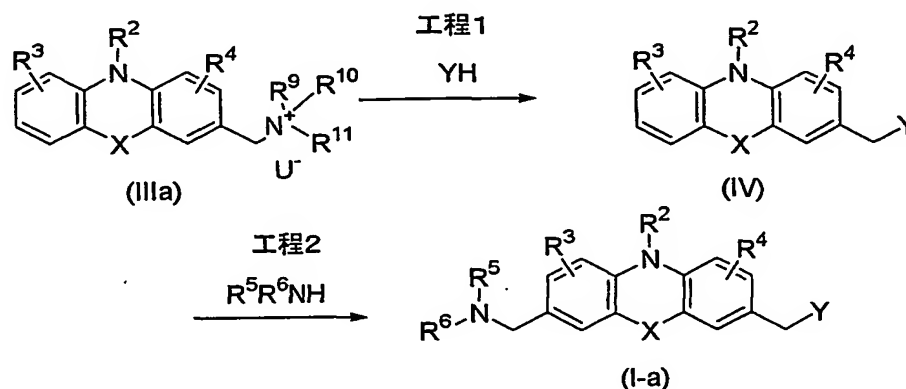
ン付加塩、アスパラギン酸付加塩、グルタミン酸付加塩等のアミノ酸付加塩等が挙げられる。

次に化合物(I)の製造法について説明する。

なお、以下に示した製造法において、定義した基が反応条件下変化するか、または方法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される方法、例えば官能基の保護、脱保護等〔例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス 第三版 (Protective Groups in Organic Synthesis, the third edition)、グリーン (T.W.Greene)、ワッツ (Peter G.M.Wuts) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999 年)〕の手段に付すことにより容易に製造を実施することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

化合物 (I-a) は、以下に示す製造方法によって得ることができる。

#### 製造法 1



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義であり、 $R^9$  は低級アルキル、アリルまたはベンジルを表し、 $R^{10}$  および  $R^{11}$  は同一または異なって低級アルキルまたはシクロアルキルを表すか、 $R^{10}$  および  $R^{11}$  が隣接する窒素原子と一緒になって複素環基を形成し、 $U$  はハロゲン、アルコキシスルホニルオキシ、アリールオキシスルホニルオキシ、アルキルスルホニルオキシまたはアリールスルホニルオキシを表す)



上記の定義において、低級アルキル、シクロアルキルおよびハロゲンはそれぞれ前記と同義である。アルコキシスルホニルオキシおよびアルキルスルホニルオキシのアルキル部分、アリールオキシスルホニルオキシおよびアリールスルホニルオキシのアリール部分は、それぞれ前記低級アルキル、アリールと同義である。隣接する窒素原子と一緒になって形成される複素環基は前記と同義である。

#### <工程 1>

化合物 (IIIa) を原料として用い、特開平 7-61983 に開示された方法に従い、1 当量～大過剰の YH (式中、Y は前記と同義である) と反応させることにより、化合物 (IV) を得ることができる。なお、化合物 (IIIa) は特開平 7-61983 に開示された方法またはそれに準じた方法により合成することができる。

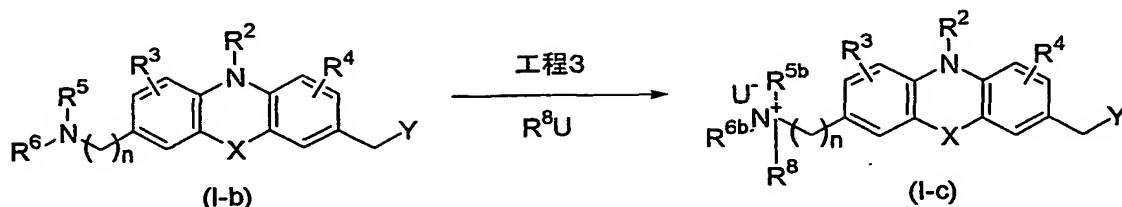
#### <工程 2>

化合物 (IV) を不活性溶媒中、1 当量～大過剰のホルムアルデヒド水溶液存在下に、1 当量～大過剰の  $R^5R^6NH$  (式中、 $R^5$  および  $R^6$  はそれぞれ前記と同義である) またはその塩酸塩と反応させることにより、化合物 (I-a) を得ることができる。また、ホルムアルデヒド水溶液に代え、トリオキシメチレン、パラホルムアルデヒド等のホルムアルデヒド等価体を用いることもできる。

反応は通常、酸性条件下で良好に進行するので、必要に応じて塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等の酸を反応系内に添加するのが好ましい。反応は通常、 $0^{\circ}C$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～ $80^{\circ}C$  の間の温度で行い、5 分間から 100 時間で終了する。不活性溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、酢酸、トリフルオロ酢酸、ジクロロエタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはクロロホルムと酢酸の混合溶媒が用いられる。

化合物 (I-b) から、以下に示す方法によって化合物 (I-c) を製造することができる。

## 製造法 2



(式中、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^{5b}$ 、 $\text{R}^{6b}$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{U}$ 、 $n$ 、 $\text{X}$  および  $\text{Y}$  はそれぞれ前記と同義である)

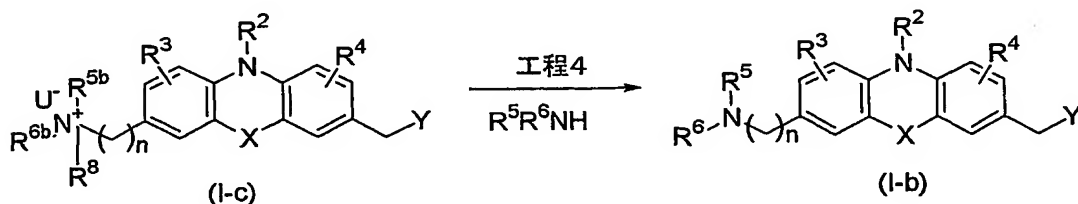
## &lt; 工程 3 &gt;

化合物 (I-b) を不活性溶媒中、1 当量～大過剰の  $\text{R}^8\text{U}$  (式中、 $\text{R}^8$  および  $\text{U}$  はそれぞれ前記と同義である) と、通常  $-10^\circ\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温で、1～48 時間反応させることにより、化合物 (I-c) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ヘキサン、アセトニトリル、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくは酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム等が用いられる。

化合物 (I-c) から、以下に示す方法によって化合物 (I-b) を製造することができる。

## 製造法 3



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義である)

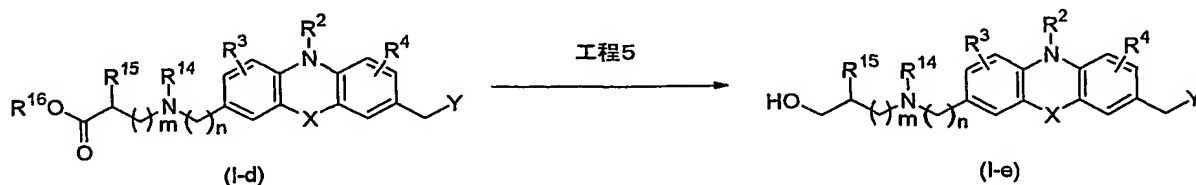
#### < 工程 4 >

化合物 (I-c) を不活性溶媒中、1 当量～大過剰の  $R^5R^6NH$  (式中、 $R^5$  および  $R^6$  はそれぞれ前記と同義である) と、通常  $-10^\circ\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは  $20^\circ\text{C}$  ～ $100^\circ\text{C}$  の間の温度で、1～100 時間反応させることにより、化合物 (I-b) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えば水、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ヘキサン、アセトニトリル、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、アセトン等が単独でまたは混合して用いられ、好ましくはクロロホルム、ジメチルホルムアミド等が用いられる。反応は通常、塩基性条件下で良好に進行するので、必要に応じて適当な塩基を反応系内に添加することが望ましい。塩基としては、例えばトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、 $N$ -メチルモルホリン、炭酸カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化カルシウム、ジイソプロピルエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデック-7-エン等を用いることができ、中でもトリエチルアミンが好ましい。

化合物 (I-b) 中、化合物 (I-d) を用い、以下に示す方法によって化合物 (I-e) を製造することができる。

#### 製造法 4



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $n$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{14}$  および

$R^{15}$  は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $R^{14}$  および  $R^{15}$  が隣接する  $\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{N}$  と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成してもよい。 $R^{16}$  は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換のアリールを表し、 $m$  は 0~3 の整数を表す)

低級アルキル、シクロアルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アラルキル、複素環アルキル、およびアリールはそれぞれ前記と同義であり、それらの置換基もそれぞれ前記と同義である。

$R^{14}$  および  $R^{15}$  が隣接する  $\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{N}$  と一緒になって形成される置換もしくは非置換の複素環としては、テトラヒドロピリジン、ピロリジン、ピペリジン、ホモピペリジン、ピペラジン、ホモピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、ペルヒドロアゼピン、ペルヒドロアゾシン、テトラヒドロキノリン、テトラヒドロイソキノリン等があげられ、それらの置換基は前記の隣接する窒素原子と一緒に形成される複素環基の置換基と同義である。

#### <工程 5>

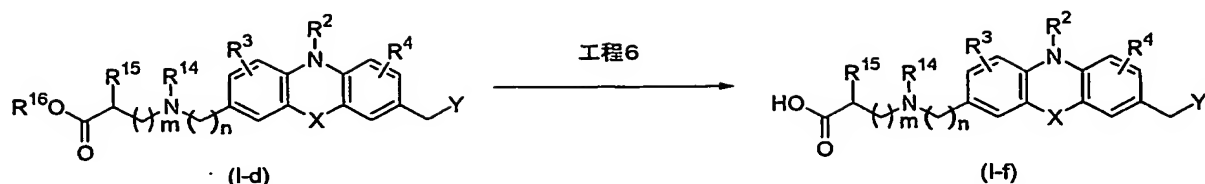
化合物 (I-d) を不活性溶媒中、通常  $-78^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$  の間の温度で、2~4 当量の水素化アルミニウムリチウム、ジイソプロピル水素化アルミニウムリチウム等、好ましくはジイソプロピル水素化アルミニウムリチウム等の還元剤存在下で 10 分間~24 時間、好ましくは 1~3 時間処理することにより化合物 (I-e) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジクロロメタンまたはトルエンが用いられる。

化合物 (I-d) から以下に示す方法によって化合物 (I-f) を製造すること

ができる。

## 製造法 5



(式中、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^{14}$ 、 $\text{R}^{15}$ 、 $\text{R}^{16}$ 、 $n$ 、 $\text{X}$ 、 $\text{Y}$  および  $m$  はそれぞれ前記と同義である)

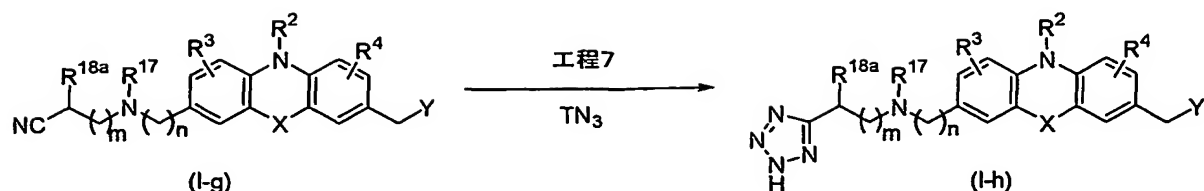
### < 工程 6 >

化合物 (I-d) を不活性溶媒中、通常  $0^\circ\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～ $100^\circ\text{C}$  の間の温度で、1 当量～大過剰の適当な塩基存在下、1～48 時間、好ましくは 1～3 時間処理することにより化合物 (I-f) を得ることができる。

適当な塩基としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウム、ナトリウムメトキシド等が例示され、好ましくは水酸化ナトリウムが挙げられる。不活性溶媒としては、例えば水、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、メタノール、エタノール、プロパノール、ジクロロメタン、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはテトラヒドロフランもしくはメタノール、またはそれらと水の混合溶媒が用いられる。

化合物 (I-c) 中、化合物 (I-g) から以下に示す方法によって化合物 (I-h) を製造することができる。

## 製造法 6



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $n$ 、 $X$ 、 $Y$  および  $m$  はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{17}$  および  $R^{18a}$  はそれぞれ前記  $R^{14}$  および前記  $R^{15}$  と同義であり、 $T$  はアルカリ金属、アンモニウム、トリアルキルシリル、またはトリアルキルチンを表す)

上記の定義においてトリアルキルシリルおよびトリアルキルチンにおけるアルキルは前記低級アルキルと同義である。アルカリ金属としてはナトリウム、カリウム等があげられる。

#### < 工程 7 >

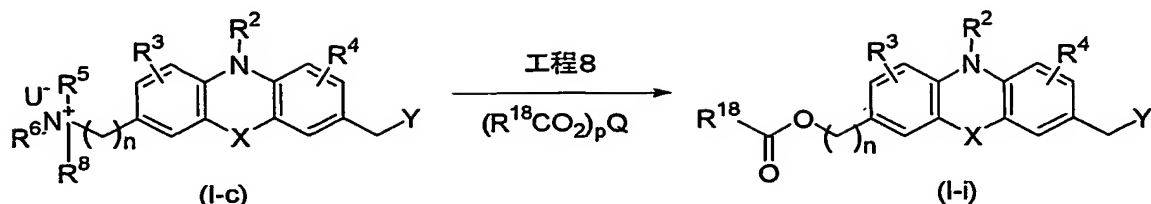
化合物 (I-g) を不活性溶媒中、 $0^{\circ}\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温～ $200^{\circ}\text{C}$  の間の温度で、1 当量～大過剰、好ましくは 2～4 当量の  $\text{TN}_3$  (式中、 $T$  は前記と同義である) と、通常反応を加速させるために触媒量～大過剰、好ましくは 0.5～2 当量の適当な添加剤の存在下、1～200 時間、好ましくは 3～48 時間反応させることにより化合物 (I-h) を得ることができる。

適当な添加剤としては、例えば四塩化けい素、塩化リチウム、塩化アルミニウム、塩化アンモニウム、塩化トリアルキルすず、酸化ジアルキルすず、トリアルキルアルミニウム、トリエチルアミン・塩酸塩、トリエチルアミン・臭化水素酸塩、水素化ナトリウム、カリウム *tert*-ブトキシド、水酸化ナトリウム、臭化亜鉛等が例示され、好ましくは塩化アンモニウム、酸化ジアルキルすず等が挙げられる。不活性溶媒としては、例えば水、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、*N*-メチル-2-ピロリドン、ジメチルスルホキシド、酢酸、氷酢酸、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、キシレン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルホルムアミドまたはトルエンが用いられる。

化合物 (I-c) から以下に示す方法によって化合物 (I-i) を製造すること

ができる。

## 製造法 7



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義であり、 $R^{18}$  は置換もしくは非置換の低級アルキルを表し、 $Q$  はアルカリ金属またはアルカリ土類金属を表し、 $Q$  がアルカリ金属の場合には  $p$  は 1 を表し、 $Q$  がアルカリ土類金属の場合には  $p$  は 2 を表す)

上記の定義においてアルカリ金属は前記アルカリ金属と同義であり、アルカリ土類金属としてはマグネシウム、カルシウム等が挙げられる。

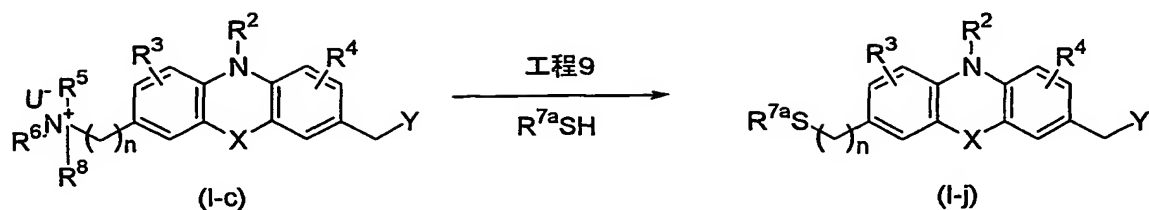
### < 工程 8 >

化合物 (I-c) を不活性溶媒中、 $0^{\circ}\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは  $70^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$  の間の温度で、1 当量～大過剰、好ましくは 4～8 当量の  $(R^{18}\text{CO}_2)_pQ$  (式中、 $R^{18}$ 、 $Q$  および  $p$  はそれぞれ前記と同義である) と、1～100 時間、好ましくは 3～72 時間反応させることにより化合物 (I-i) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジメチルアセトアミド、 $N$ -メチル-2-ピロリドン、ジメチルスルホキシド等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルスルホキシドが用いられる。

化合物 (I-c) から以下に示す方法によって化合物 (I-j) を製造することができる。

## 製造法 8



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 9>

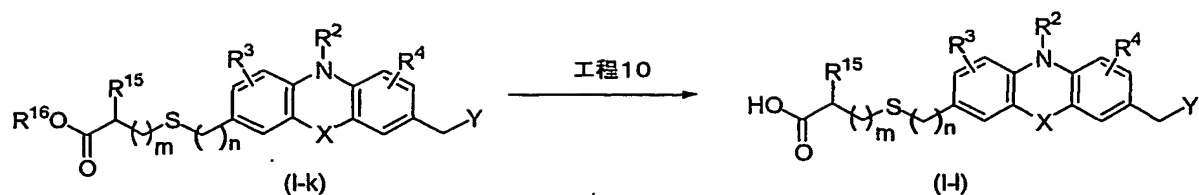
化合物(I-c)を不活性溶媒中、 $0^{\circ}\text{C}$ から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは $30^{\circ}\text{C}$ ～ $80^{\circ}\text{C}$ の間の温度で、1当量～大過剰、好ましくは2～8当量の $R^{7a}\text{SH}$ (式中、 $R^{7a}$ は前記と同義である)と、1当量～大過剰、好ましくは1～3当量の適当な塩基存在下、1～100時間、好ましくは3～72時間反応させることにより化合物(I-j)を得ることができる。

適当な塩基としては、例えばトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、 $N$ -メチルモルホリン、炭酸カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化カルシウム、ジイソプロピルエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデック-7-エン等を用いることができ、中でも1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデック-7-エンが好ましい。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ジメチルアセトアミド、 $N$ -メチル-2-ピロリドン、ジメチルスルホキシド等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはクロロホルムが用いられる。

化合物(I-j)中、化合物(I-k)から以下に示す方法によって化合物(I-1)を製造することができる。

#### 製造法 9





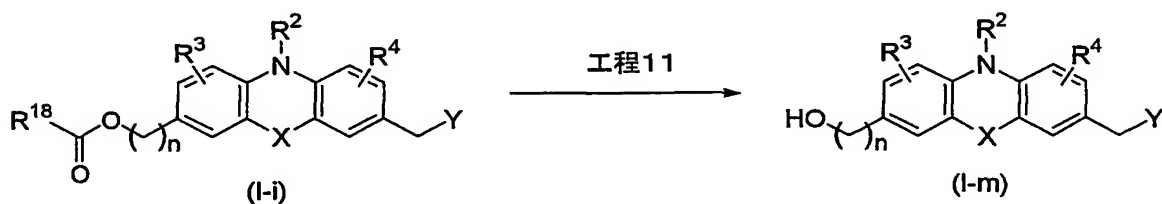
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $m$ 、 $n$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義である)

#### < 工程 10 >

化合物 (I-k) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-l) を製造することができる。

化合物 (I-i) から以下に示す方法によって化合物 (I-m) を製造することができる。

#### 製造法 10



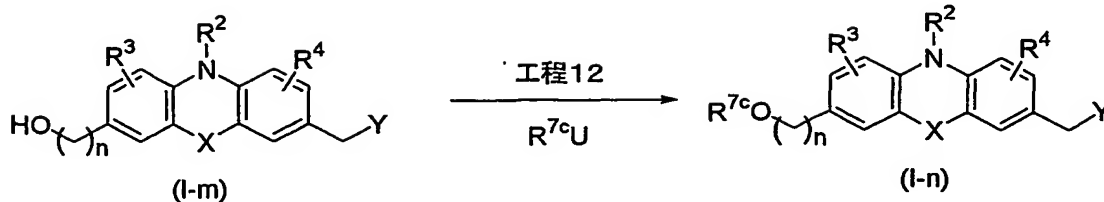
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{18}$ 、 $n$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義である)

#### < 工程 11 >

化合物 (I-i) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-m) を製造することができる。

化合物 (I-m) から以下に示す方法によって化合物 (I-n) を製造することができる。

#### 製造法 11



(式中、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{U}$ 、 $n$ 、 $\text{X}$  および  $\text{Y}$  はそれぞれ前記と同義であり、 $\text{R}^{7c}$  は前記  $\text{R}^7$  の定義から水素を除いた基を表す)

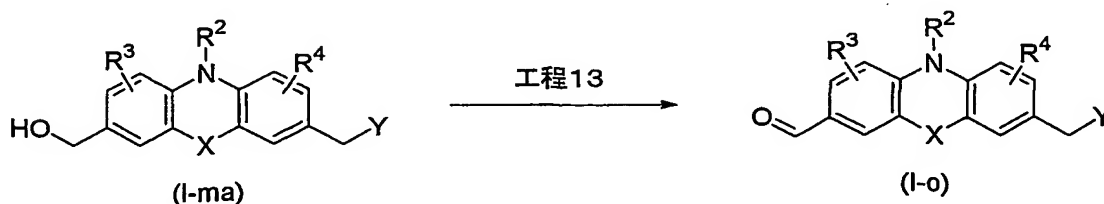
#### < 工程 1 2 >

化合物 (I-m) を不活性溶媒中、 $0^\circ\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温から  $80^\circ\text{C}$  の間の温度で、1 当量～大過剰、好ましくは 1～3 当量の適当な塩基存在下、1 当量～大過剰、好ましくは 1～3 当量の  $\text{R}^{7c}\text{U}$  (式中、 $\text{R}^{7c}$  および  $\text{U}$  はそれぞれ前記と同義である) と、1～48 時間、好ましくは 3～24 時間反応させることにより化合物 (I-n) を得ることができる。

適当な塩基としては、例えば炭酸カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、水素化カルシウム、低級アルキルリチウム等が例示され、好ましくは、水素化ナトリウム、水素化カリウム等が挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、 $N$ -メチル-2-ピロリドン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはクロロホルムが用いられる。

化合物 (I-m) において  $n=1$  である化合物 (I-ma) から以下に示す方法によって化合物 (I-o) を製造することができる。

#### 製造法 1 2



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義である)

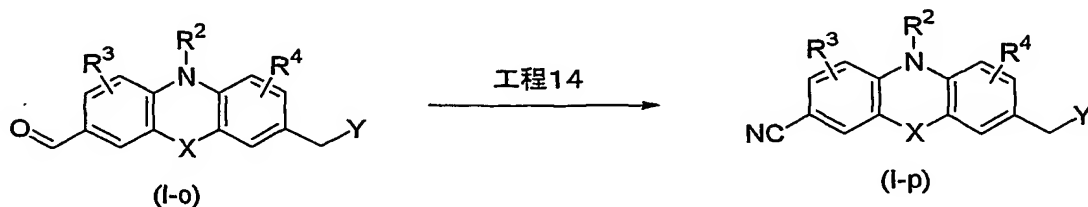
### <工程 1 3>

化合物 (I-ma) を不活性溶媒中、 $0^{\circ}\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは室温から  $60^{\circ}\text{C}$  の間の温度で、1 当量～大過剰、好ましくは 3～6 当量の適当な酸化剤存在下、1～48 時間、好ましくは 3～24 時間処理することにより化合物 (I-o) を得ることができる。

適当な酸化剤としては、例えば二酸化マンガン、クロム酸、クロロクロム酸ピリジニウム、ニクロム酸ピリジニウム、過マンガン酸カリウム、三酸化硫黄-ピリジン、オキソン等が挙げられ、好ましくは二酸化マンガンが挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸、プロピオン酸、酪酸、トリフルオロ酢酸、水、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、 $N$ -メチル-2-ピロリドン、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン等が用いられる。

化合物 (I-o) から以下に示す方法によって化合物 (I-p) を製造することができる。

### 製造法 1 3



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$  および  $Y$  はそれぞれ前記と同義である)

### <工程 1 4>

化合物 (I-o) を不活性溶媒中、 $0^{\circ}\text{C}$  から反応に用いた溶媒の沸点の間の温

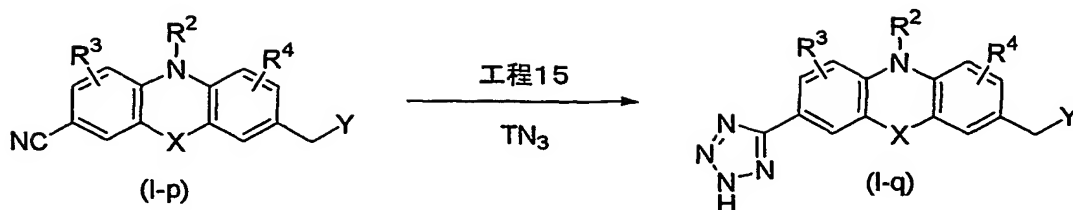
度、好ましくは室温から 90℃の間の温度で、1 当量～大過剰、好ましくは 1～3 当量のヒドロキシルアミンもしくはその塩酸塩、硫酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等、0-フェニルカーバミルヒドロキシルアミンもしくはその塩酸塩、硫酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等、または N-ヒドロキシベンズアミド、好ましくはヒドロキシルアミンと、1～48 時間、好ましくは 3～24 時間反応させることにより化合物 (I-p) を得ることができる。必要により、1 当量～大過剰、好ましくは 1～3 当量の適当な脱水剤の添加や、1 当量～大過剰、好ましくは 2～6 当量の適当な塩基の添加、またはマイクロ波照射を行ってもよい。

適当な脱水剤としては、例えば無水酢酸、無水フタル酸、硫酸水素ナトリウム、オキソソ、ギ酸ナトリウム、酸化ジアルキルすず、アルミナ、シリカゲル、酢酸ナトリウム、ホルムアミド、五酸化二リン、塩化鉄 (III)、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、オキシ塩化リン、パラトルエンスルホン酸等が例示され、好ましくは無水酢酸、無水フタル酸等が挙げられる。適当な塩基としては、例えばトリエチルアミン、ピリジン、水素化ナトリウム、水素化カリウム等が例示され、好ましくはトリエチルアミンまたはピリジンが挙げられる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ニトロベンゼン、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸、プロピオン酸、酪酸、トリフルオロ酢酸、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチル-2-ピロリドン、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、メタノール、エタノール、プロパノール等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはアセトニトリル、ジメチルホルムアミド等が用いられる。

化合物 (I-p) から以下に示す方法によって化合物 (I-q) を製造することができる。

#### 製造法 14



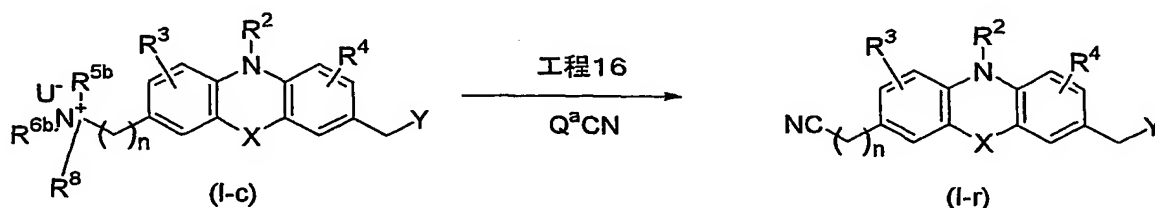
(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $T$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### < 工程 15 >

化合物 (I-p) を用いて製造法 6 の工程 7 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-q) を製造することができる。

化合物 (I-c) から以下に示す方法によって化合物 (I-r) を製造することができる。

#### 製造法 15



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^8$ 、 $U$ 、 $n$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義であり、 $Q^a$ は前記と同義のアルカリ金属を表す)

#### < 工程 16 >

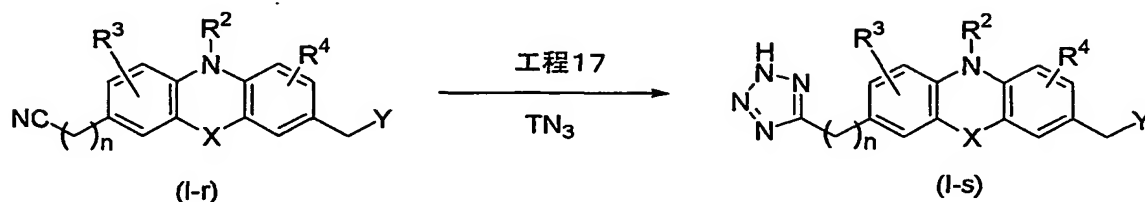
化合物 (I-c) を不活性溶媒中、室温から反応に用いた溶媒の沸点の間の温度、好ましくは  $40^\circ\text{C}$ ～ $80^\circ\text{C}$  の間の温度で、1 当量～大過剰、好ましくは 2～4 当量の  $Q^a\text{CN}$  (式中、 $Q^a$ は前記と同義である)、好ましくは青酸ナトリウムと、1～48 時間、好ましくは 3～24 時間反応させることにより化合物 (I-r) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、*N*-メチル-2-ピロリドン、1,4-ジオキサン、テトラヒ

ドロフラン等を単独でまたは混合して用いることができ、好ましくはジメチルホルムアミド等が用いられる。

化合物 (I-r) から以下に示す方法によって化合物 (I-s) を製造することができる。

#### 製造法 16



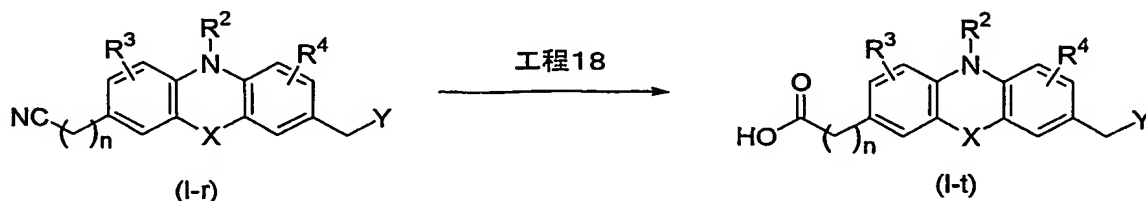
(式中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、T、n、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 17>

化合物 (I-r) を用いて製造法 6 の工程 7 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-s) を製造することができる。

化合物 (I-r) から以下に示す方法によって化合物 (I-t) を製造することができる。

#### 製造法 17



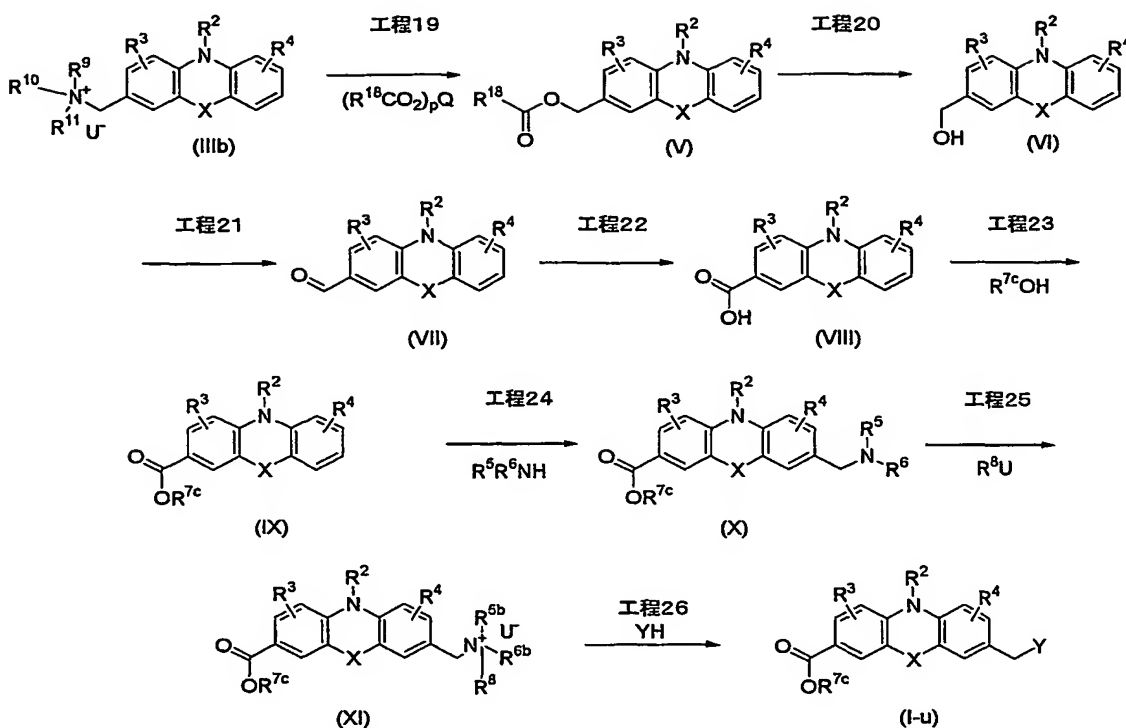
(式中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、n、XおよびYはそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 18>

化合物 (I-r) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-t) を製造することができる。

化合物 (IIIb) から以下に示す方法によって化合物 (I-u) を製造することができる。

#### 製造法 18



(式中、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6b}$ 、 $R^{7c}$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{18}$ 、 $Q$ 、 $p$ 、 $U$ 、 $X$ および $Y$ はそれぞれ前記と同義である)

#### <工程 19>

化合物 (IIIb) を用いて製造法 7 の工程 8 と同様な反応を行うことにより化合物 (V) を製造することができる。

#### <工程 20>

化合物 (V) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (VI) を製造することができる。

#### <工程 21>

化合物 (VI) を用いて製造法 12 の工程 13 と同様な反応を行うことにより化合物 (VII) を製造することができる。

### <工程 2 2>

化合物 (VII) を不活性溶媒中、通常  $0^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$  の間の温度で、2~4 当量の硝酸銀、酸化銀 (I)、酸化銀 (II)、クロム酸、クロロクロム酸ピリジニウム、ニクロロクロム酸ピリジニウム、過マンガン酸カリウム、過ヨウ素酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、過酸化水素、亜塩素酸ナトリウム等の酸化剤、好ましくは硝酸銀または過塩素酸ナトリウム存在下で、10 分間~24 時間、好ましくは 1~4 時間処理することにより化合物 (VIII) を製造することができる。必要により、添加剤として、0.1~4 当量の酢酸等の有機物、または硫酸、リン酸二水素ナトリウム、スルファミン酸、酸化ルテミウム等の無機物を加えてもよい。

不活性溶媒としては、例えばジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、アセトニトリル、酢酸エチル、酢酸メチル、メチルエチルケトン、塩酸、酢酸、無水酢酸、硫酸、水等が挙げられ、好ましくはアセトニトリル、水等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。

### <工程 2 3>

化合物 (VIII) を不活性溶媒中、通常  $0^{\circ}\text{C} \sim 80^{\circ}\text{C}$  の間の温度、好ましくは室温で、1~20 当量のハロゲン化剤と 10 分間~24 時間反応させ、その後、1 当量~大過剰の  $\text{R}^7\text{OH}$  (式中、 $\text{R}^7$  は前記と同義である) と反応させることにより化合物 (IX) を製造することができる。

ハロゲン化剤としては、例えば塩化チオニル、オキサリルクロリド、オキシ塩化リン等が挙げられ、好ましくは塩化チオニルが挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、1,4-ジオキサン、アセトニトリル、ベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられ、これらは単独でまたは混合して用いることができる。不活性溶媒として好ましくはジクロロメタンが挙げられる。

### <工程 2 4>

化合物 (IX) を用いて製造法 1 の工程 2 と同様な反応を行うことにより化



化合物 (X) を製造することができる。

< 工程 25 >

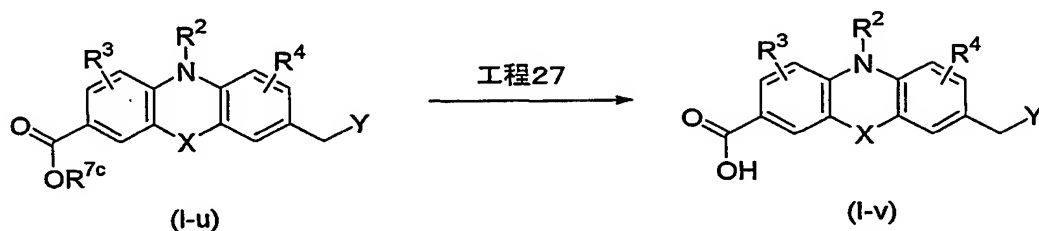
化合物 (X) を用いて製造法 2 の工程 3 と同様な反応を行うことにより化合物 (XI) を製造することができる。

< 工程 26 >

化合物 (XI) を用いて製造法 1 の工程 1 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-u) を製造することができる。

化合物 (I-u) から以下に示す方法によって化合物 (I-v) を製造することができる。

製造法 19



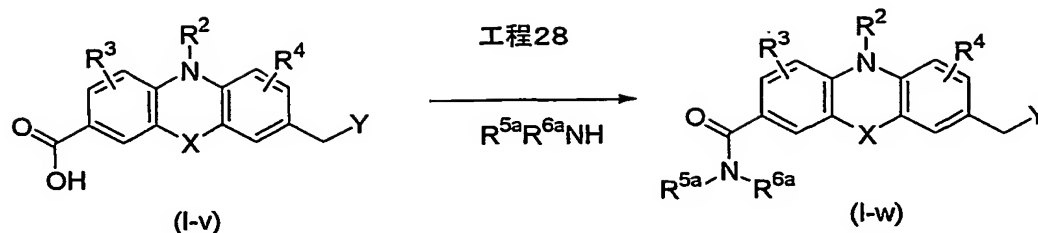
(式中、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^{7c}$ 、X および Y はそれぞれ前記と同義である)

< 工程 27 >

化合物 (I-u) を用いて製造法 5 の工程 6 と同様な反応を行うことにより化合物 (I-v) を製造することができる。

化合物 (I-v) から以下に示す方法によって化合物 (I-w) を製造することができる。

製造法 20



(式中、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5\text{a}$ 、 $\text{R}^6\text{a}$ 、 $\text{X}$  および  $\text{Y}$  はそれぞれ前記と同義である)

#### < 工程 28 >

化合物 (I-v) を不活性溶媒中、通常  $0^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$  の間の温度、好ましくは室温で、1～20 当量のハロゲン化剤と 10 分間～24 時間反応させ、その後、1 当量～大過剰の  $\text{R}^5\text{aR}^6\text{aNH}$  (式中、 $\text{R}^5\text{a}$  および  $\text{R}^6\text{a}$  はそれぞれ前記と同義である) と反応させることにより化合物 (I-w) を製造することができる。必要に応じて、1 当量～大過剰の適当な塩基を加えてもよい。

ハロゲン化剤としては、例えば塩化チオニル、オキサリルクロリド、オキシ塩化リン等が挙げられ、好ましくは塩化チオニルが挙げられる。適当な塩基としては、例えばピリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、 $\text{N}$ -メチルモルホリン等が例示され、好ましくはトリエチルアミンが挙げられる。不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、1,4-ジオキサン、アセトニトリル、ベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いることができる。不活性溶媒として好ましくはジクロロメタンが挙げられる。

化合物 (I-w) の製造においては、ペプチド化学で常用される手法を用いることもできる。すなわち、化合物 (I-v) に不活性溶媒中、0.5～10 当量の適当な縮合剤と共に 1～10 当量の  $\text{R}^5\text{aR}^6\text{aNH}$  (式中、 $\text{R}^5\text{a}$  および  $\text{R}^6\text{a}$  はそれぞれ前記と同義である) を加え、通常、 $0^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$  の間の温度で 10 分間～70 時間反応させることにより化合物 (I-w) を得ることができる。

不活性溶媒としては、例えばジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ベンゼン、トルエン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチ

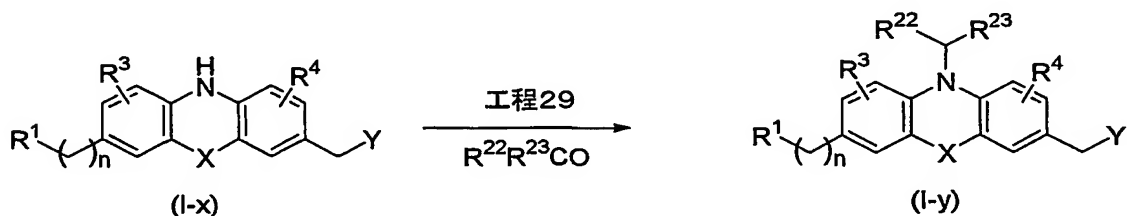
ル、ピリジン、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等が挙げられ、好ましくはテトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド等が挙げられる。

適当な縮合剤としては、例えば 1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド結合ポリスチレンレジン (EDC レジン) 等が挙げられる。また、N-ヒドロキシコハク酸イミド、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等、好ましくは 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の添加剤を加えることもできる。

EDC レジンは、テトラヘドロン レターズ (Tetrahedron Letters)、34 巻、48 号、7685 頁 (1993 年) 記載の方法で製造することができる。

化合物 (I) 中、化合物 (I-x) から、以下に示す方法によって化合物 (I-y) を製造することができる。

#### 製造法 2 1



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $n$ 、 $\text{X}$  および  $\text{Y}$  はそれぞれ前記と同義であり、 $\text{R}^{22}$  および  $\text{R}^{23}$  は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)

上記の定義において低級アルキル、シクロアルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アラルキル、および複素環アルキルはそれぞれ前記と同義であり、それらの置換基もそれぞれ前記と同義である。

< 工程 2 9 >

化合物 (I-x) を不活性溶媒中、1 当量～大過剰の、好ましくは 1～10 当量の  $R^{22}R^{23}CO$  (式中、 $R^{22}$  および  $R^{23}$  はそれぞれ前記と同義である) と、1 当量～大過剰、好ましくは 1～3 当量の適当な還元剤の存在下、通常  $-78^{\circ}C \sim 100^{\circ}C$  の間の温度、好ましくは  $0^{\circ}C \sim 50^{\circ}C$  の間の温度で 10 分間～48 時間反応させることにより化合物 (I-y) を得ることができる。

適当な還元剤としては、例えば水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等が挙げられ、好ましくはシアノ水素化ホウ素ナトリウムが挙げられる。必要により、触媒量～溶媒量、好ましくは 0.5 当量～溶媒量の適当な酸を添加してもよい。適当な酸としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、塩酸等が挙げられ、好ましくは酢酸が挙げられる。

不活性溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジエチルエーテル、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、アセトニトリル、ヘキサン、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、塩酸等が例示され、これらを単独でまたは混合して用いることができる。好ましくは、テトラヒドロフラン、酢酸等が挙げられる。

化合物 (I) および原料化合物における各官能基の変換および置換基に含まれる官能基の変換は、公知の方法 [例えば、コンプリヘンシブ・オーガニック・トランスフォーメーションズ 第二版 (Comprehensive Organic Transformations, second edition)、R.C. ラロック (Larock) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレーティッド (John Wiley & Sons Inc.) (1999 年) に記載の方法] 等によっても行うことができる。

上記の方法等を適宜組み合わせて実施することにより、所望の位置に所望の官能基を有する化合物 (I) を得ることができる。

上記製造法における中間体および生成物の単離、精製は、通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組み合わせて行うことができる。さらに一般的な並列合成法で常用される精製法、例えば、スカベンジャーレジン、イオン交換レジンを用いた精製法によっても行うことができる。また、中間体におい

ては、特に精製することなく次の反応に供することもできる。

化合物(I)には、位置異性体、幾何異性体、光学異性体または互変異性体のような異性体が存在し得るものもあるが、これらを含め可能な全ての異性体および該異性体のいかなる比率における混合物も本発明に包含される。

化合物(I)の塩を取得したい場合には、化合物(I)の塩が得られるときはそのまま精製すればよく、また化合物(I)が遊離の形で得られるときは化合物(I)を適当な溶媒に溶解または懸濁し、酸または塩基を加えて単離・精製すればよい。

また、化合物(I)またはその薬理学的に許容される塩は、水または各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明に包含される。

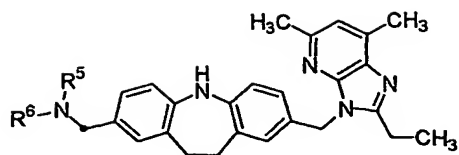
本発明の掻痒治療剤のスクリーニング法において、掻痒治療活性を有する化合物は、

- 1) ヒトを除く哺乳類動物に SPC を皮下および皮内投与することによりヒトを除く哺乳類動物における掻破行動を誘発させ、
- 2) 試験化合物存在下または非存在下での SPC により誘発されたヒトを除く哺乳類動物における掻破行動の回数を測定し、
- 3) 試験化合物存在下と試験化合物非存在下での SPC により誘発されたヒトを除く哺乳類動物における掻破行動の回数を比較し、
- 4) 試験化合物から SPC により誘発された掻破行動の回数を減少させる物質を選択することにより取得することができる。

上記のヒトを除く哺乳類動物としては、例えばマウス等が挙げられ、掻破行動とは動物が後肢で自身の体部を掻く行動をいう。掻痒治療剤のスクリーニング法のより具体的な例としては、例えば後記の試験例 2 に記載の方法等が挙げられる。

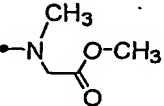
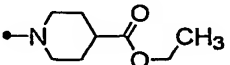
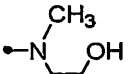
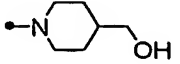
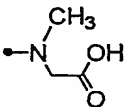
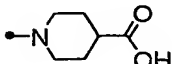
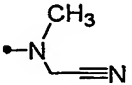
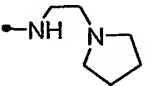
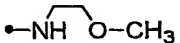
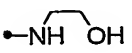
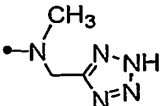
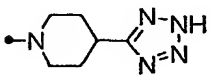
以下、第 1 表～第 12 表に本発明によって得られる化合物(I)の具体例を示すが、本発明の範囲はこれらの化合物に限定されることはない。また、GPR4 のシグナル伝達に関する機能を抑制するその他の化合物の具体例を第 13 表に示す。

第1表

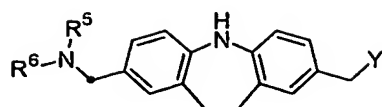


| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{NR}^5\text{R}^6$ |
|-----------|--------------------------------|
| 1         |                                |
| 2         |                                |
| 3         |                                |
| 4         |                                |
| 5         |                                |
| 6         |                                |
| 7         |                                |
| 8         |                                |
| 9         |                                |
| 10        |                                |
| 11        |                                |
| 12        |                                |
| 13        |                                |
| 14        |                                |

第1表 (続き)

| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$   |
|-----------|---|
| 15        |    |
| 16        |    |
| 17        |    |
| 18        |    |
| 19        |    |
| 20        |   |
| 21        |  |
| 22        |  |
| 23        |  |
| 24        |  |
| 25        | $\bullet\text{-NH}_2$   |
| 26        |  |
| 27        |  |

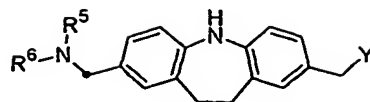
第2表



| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ | $\bullet\text{-Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 28        |                                 |                    | MS m/z 438 (M+H) <sup>+</sup> |
| 29        |                                 |                    | MS m/z 421 (M+H) <sup>+</sup> |
| 30        |                                 |                    | MS m/z 409 (M+H) <sup>+</sup> |
| 31        |                                 |                    | MS m/z 451 (M+H) <sup>+</sup> |
| 32        |                                 |                    | MS m/z 506 (M+H) <sup>+</sup> |
| 33        |                                 |                    | MS m/z 513 (M+H) <sup>+</sup> |
| 34        |                                 |                    | MS m/z 514 (M+H) <sup>+</sup> |
| 35        |                                 |                    | MS m/z 496 (M+H) <sup>+</sup> |
| 36        |                                 |                    | MS m/z 425 (M+H) <sup>+</sup> |
| 37        |                                 |                    | MS m/z 427 (M+H) <sup>+</sup> |
| 38        |                                 |                    | MS m/z 425 (M+H) <sup>+</sup> |
| 39        |                                 |                    | MS m/z 471 (M+H) <sup>+</sup> |

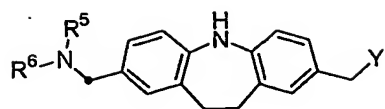


第3表



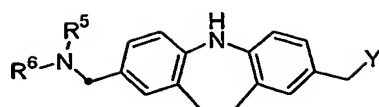
| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ | $\bullet\text{-Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 40        |                                 |                    | MS m/z 514 (M+H) <sup>+</sup> |
| 41        |                                 |                    | MS m/z 497 (M+H) <sup>+</sup> |
| 42        |                                 |                    | MS m/z 485 (M+H) <sup>+</sup> |
| 43        |                                 |                    | MS m/z 527 (M+H) <sup>+</sup> |
| 44        |                                 |                    | MS m/z 582 (M+H) <sup>+</sup> |
| 45        |                                 |                    | MS m/z 589 (M+H) <sup>+</sup> |
| 46        |                                 |                    | MS m/z 590 (M+H) <sup>+</sup> |
| 47        |                                 |                    | MS m/z 572 (M+H) <sup>+</sup> |
| 48        |                                 |                    | MS m/z 501 (M+H) <sup>+</sup> |
| 49        |                                 |                    | MS m/z 503 (M+H) <sup>+</sup> |
| 50        |                                 |                    | MS m/z 501 (M+H) <sup>+</sup> |
| 51        |                                 |                    | MS m/z 547 (M+H) <sup>+</sup> |

第4表



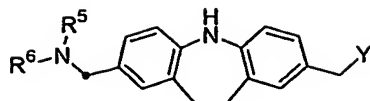
| 化合物<br>番号 | ●—NR <sup>5</sup> R <sup>6</sup> | ●—Y | 質量分析値                         |
|-----------|----------------------------------|-----|-------------------------------|
| 52        |                                  |     | MS m/z 452 (M+H) <sup>+</sup> |
| 53        |                                  |     | MS m/z 435 (M+H) <sup>+</sup> |
| 54        |                                  |     | MS m/z 423 (M+H) <sup>+</sup> |
| 55        |                                  |     | MS m/z 465 (M+H) <sup>+</sup> |
| 56        |                                  |     | MS m/z 520 (M+H) <sup>+</sup> |
| 57        |                                  |     | MS m/z 527 (M+H) <sup>+</sup> |
| 58        |                                  |     | MS m/z 528 (M+H) <sup>+</sup> |
| 59        |                                  |     | MS m/z 510 (M+H) <sup>+</sup> |
| 60        |                                  |     | MS m/z 439 (M+H) <sup>+</sup> |
| 61        |                                  |     | MS m/z 441 (M+H) <sup>+</sup> |
| 62        |                                  |     | MS m/z 439 (M+H) <sup>+</sup> |
| 63        |                                  |     | MS m/z 485 (M+H) <sup>+</sup> |

第5表



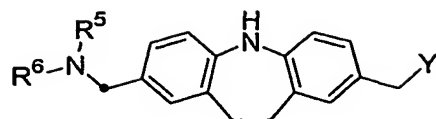
| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ | $\bullet\text{-Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 64        |                                 |                    | MS m/z 466 (M+H) <sup>+</sup> |
| 65        |                                 |                    | MS m/z 449 (M+H) <sup>+</sup> |
| 66        |                                 |                    | MS m/z 437 (M+H) <sup>+</sup> |
| 67        |                                 |                    | MS m/z 479 (M+H) <sup>+</sup> |
| 68        |                                 |                    | MS m/z 534 (M+H) <sup>+</sup> |
| 69        |                                 |                    | MS m/z 541 (M+H) <sup>+</sup> |
| 70        |                                 |                    | MS m/z 542 (M+H) <sup>+</sup> |
| 71        |                                 |                    | MS m/z 524 (M+H) <sup>+</sup> |
| 72        |                                 |                    | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 73        |                                 |                    | MS m/z 455 (M+H) <sup>+</sup> |
| 74        |                                 |                    | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 75        |                                 |                    | MS m/z 499 (M+H) <sup>+</sup> |

第6表



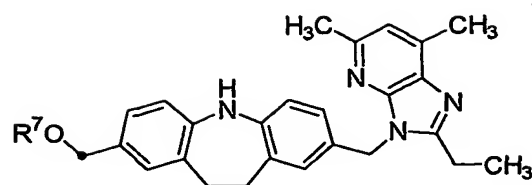
| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ | $\bullet\text{-Y}$ | 質量分析値                         |
|-----------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 76        |                                 |                    | MS m/z 466 (M+H) <sup>+</sup> |
| 77        |                                 |                    | MS m/z 449 (M+H) <sup>+</sup> |
| 78        |                                 |                    | MS m/z 437 (M+H) <sup>+</sup> |
| 79        |                                 |                    | MS m/z 479 (M+H) <sup>+</sup> |
| 80        |                                 |                    | MS m/z 534 (M+H) <sup>+</sup> |
| 81        |                                 |                    | MS m/z 541 (M+H) <sup>+</sup> |
| 82        |                                 |                    | MS m/z 542 (M+H) <sup>+</sup> |
| 83        |                                 |                    | MS m/z 524 (M+H) <sup>+</sup> |
| 84        |                                 |                    | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 85        |                                 |                    | MS m/z 455 (M+H) <sup>+</sup> |
| 86        |                                 |                    | MS m/z 453 (M+H) <sup>+</sup> |
| 87        |                                 |                    | MS m/z 499 (M+H) <sup>+</sup> |

第7表



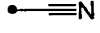
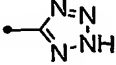
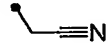
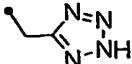
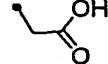
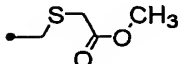
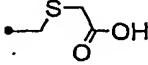
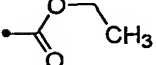

| 化合物<br>番号 | $\text{—NR}^5\text{R}^6$ | $\text{—Y}$ |
|-----------|--------------------------|-------------|
| 88        |                          |             |
| 89        |                          |             |
| 90        |                          |             |

第8表

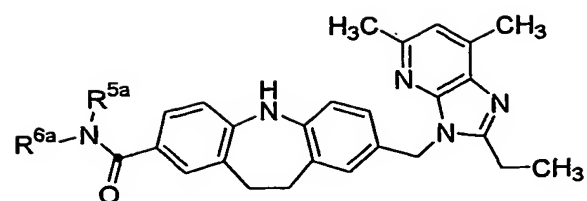


| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-OR}^7$   |
|-----------|-------------------------|
| 92        |                         |
| 93        | $\bullet\text{-OH}$     |
| 94        | $\bullet\text{-O-CH}_3$ |
| 95        |                         |
| 96        |                         |
| 97        |                         |
| 98        |                         |
| 99        |                         |
| 100       |                         |
| 101       |                         |
| 102       |                         |

第9表

| 化合物<br>番号 | R <sup>1</sup>  |
|-----------|---|
| 103       |    |
| 104       |    |
| 105       |   |
| 106       |  |
| 107       |  |
| 108       |  |
| 109       |  |
| 110       |  |
| 111       |  |

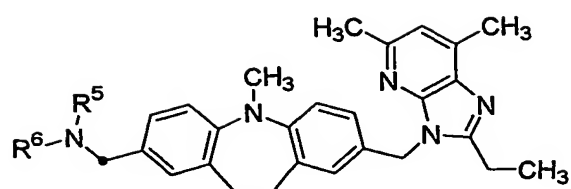
第10表



| 化合物<br>番号 | •NR <sup>5a</sup> R <sup>6a</sup> |
|-----------|-----------------------------------|
| 112       |                                   |
| 113       |                                   |
| 114       |                                   |
| 115       |                                   |
| 116       |                                   |
| 117       |                                   |
| 118       |                                   |
| 119       | •NH <sub>2</sub>                  |

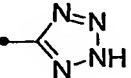
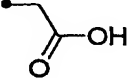


第11表

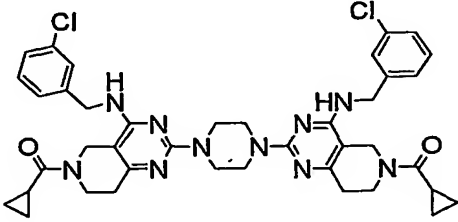


| 化合物<br>番号 | $\bullet\text{-NR}^5\text{R}^6$ |
|-----------|---------------------------------|
| 120       |                                 |
| 121       |                                 |
| 122       |                                 |
| 123       |                                 |

第12表

| 化合物<br>番号 | •R <sup>1</sup>   |
|-----------|---|
| 124       |  |
| 125       |  |

第13表

| 化合物<br>番号 |  |
|-----------|--|
| 91        |  |

第14表

| 化合物<br>番号 | 分析値                           |
|-----------|-------------------------------|
| 5         | MS m/z 508 (M+H) <sup>+</sup> |
| 6         | MS m/z 563 (M+H) <sup>+</sup> |
| 7         | MS m/z 570 (M+H) <sup>+</sup> |
| 8         | MS m/z 571 (M+H) <sup>+</sup> |
| 9         | MS m/z 553 (M+H) <sup>+</sup> |
| 10        | MS m/z 484 (M+H) <sup>+</sup> |
| 11        | MS m/z 482 (M+H) <sup>+</sup> |
| 12        | MS m/z 528 (M+H) <sup>+</sup> |

図面の簡単な説明

第1図は化合物1（経口投与）のSPC誘発搔痒に対する抑制作用を示す。

第1図において、符号（##、\*\*）は各々下記の意味を表す。

##：P=0.0083の有意差を表す（陽性対照群の陰性対象群比；Aspin-Welch test）。

\*\*：P=0.0031の有意差を表す（化合物1経口投与群の陽性対照群比；Aspin-Welch test）。

第2図は化合物3（経口投与）のSPC誘発搔痒に対する抑制作用を示す。

第2図において、符号（##、\*\*）は各々下記の意味を表す。

##：P=0.0029の有意差を表す（陽性対照群の陰性対象群比；Aspin-Welch test）。

\*\*：P=0.0031の有意差を表す（化合物3経口投与群の陽性対照群比；Aspin-Welch test）。

次に化合物の薬理作用について試験例で説明する。

試験例1：GPR4拮抗作用

参考例 5 で得られた GPR4 アッセイ細胞（該アッセイ細胞は  $17\beta$ -エストラジオールの刺激により GPR4 を発現する）を白色プレートに 1 ウェル当たり  $10^5$  個を播種し、反応液中 10 nmol/L になるように  $17\beta$ -エストラジオール（ $17\beta$ -estradiol、シグマ社製）を培地で希釈したものと試験化合物を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  インキュベーター中で 6 時間反応した。その後、Steady Glo Luciferase Assay System（Promega 社製）溶液を加え反応を停止し、トップカウント（Packard, Meriden, CT, USA）で 1 秒間の発光量を測定した。

試験化合物の活性（拮抗作用）は、下の式に示す通り  $17\beta$ -エストラジオール添加時と非添加時のカウント数（count per second）をもとに算出した阻害率で表した。 $\text{IC}_{50}$  値は、阻害率から Logit-Log 変換法の線形近似解析法によって算出した。

式中、A、B、C は各々以下の意味を表す。

A :  $17\beta$ -エストラジオール及び試験化合物を添加時のカウント数

B :  $17\beta$ -エストラジオールおよび試験化合物の両方が非添加時のカウント数

C :  $17\beta$ -エストラジオールのみ添加時のカウント数

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - \{(A - B) / (C - B)\}] \times 100$$

結果を第 15 表に示す。

第 15 表

| 化合物番号 | $\text{IC}_{50}(\text{nmol/L})$ |
|-------|---------------------------------|
| 1     | 4.0                             |
| 2     | 3.2                             |
| 3     | 2.3                             |
| 4     | 5.8                             |
| 5     | 14                              |

以上の結果より、化合物 (I) は GPR4 拮抗作用を有することが示された。

## 試験例 2 : SPC 誘発搔痒に対する抑制作用

ddY 雄性マウス (3~4 週齢) 背部に SPC (50  $\mu$ g/site) を皮下投与 (SPC 投与群) 後、該マウスをアクリル製観察用ケージ (7.5 x 7.5 x 15 cm) に入れ、ビデオカメラを用いて 60 分間無人下でマウスの行動を撮影した。ビデオを再生し、後肢による搔破行動 (scratching behavior) の回数を目視でカウントした。陰性対照群 (生理食塩液投与群) には SPC の代わりに生理食塩液 (0.1 mL/site) を投与した。化合物投与群では、0.5 重量/容量 (w/v) % メチルセルロース (MC) 水溶液に化合物 1 および化合物 3 (300 mg/kg) をそれぞれ懸濁し、SPC 投与 1 時間前に経口投与した。なお SPC 投与群および生理食塩液投与群ではそれぞれ SPC および生理食塩液投与 1 時間前に 0.5 w/v% MC 水溶液 (10 mL/kg) を経口投与した。試験は 1 群 10 匹で行った。化合物による SPC 誘発搔破行動の抑制率は以下の数式で求めた。

数式中、A、B はそれぞれ以下の意味を表す。

A : SPC 投与群の搔破行動 (scratching behavior) の回数

B : 化合物投与群の搔破行動 (scratching behavior) の回数

$$\text{抑制率 (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

化合物 1 の結果を第 1 図、化合物 3 の結果を第 2 図に示す。

第 1 図に示すように、SPC 投与群の搔破行動回数 (78 回) は陰性対照群の搔破行動回数 (23 回) と比べ有意に増加した ( $P=0.0083$ )。化合物 1 投与群の搔破行動回数は 13 回であり、化合物 1 投与群では陽性対照群の搔破行動回数が 83% 抑制された ( $P=0.0031$ )。

第 2 図に示すように、SPC 投与群の搔破行動回数 (69 回) は陰性対照群の搔破行動回数 (18 回) と比べ有意に増加した ( $P=0.0029$ )。化合物 3 投与群の搔破行動回数は 18 回であり、化合物 1 投与群では陽性対照群の搔破行動回数が 74% 抑制された ( $P=0.0031$ )。

以上の結果から、配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグ

ナル伝達に関する機能を抑制する物質は掻痒治療剤として有用であることが示唆された。

### 試験例 3 : Compound 48/80 (シグマ社製) 誘発掻痒に対する作用

ddY 系マウス (4 週齢) 背部に Compound 48/80 (10  $\mu$ g/site) を皮下投与 (Compound 48/80 投与群) 後、該マウスをアクリル製観察用ケージ (7.5 x 7.5 x 15 cm) に入れ、ビデオカメラを用いて 60 分間無人下でマウスの行動を撮影した。ビデオを再生し、後肢による掻破行動 (scratching behavior) の回数を目視でカウントした。陰性対照群 (生理食塩液投与群) では Compound 48/80 の代わりに生理食塩液 (0.1 mL/site) を投与した。化合物投与群では、0.5 w/v%MC 水溶液に化合物 1 および化合物 3 (300 mg/kg) をそれぞれ懸濁し、Compound 48/80 投与 1 時間前に経口投与した。なお Compound 48/80 投与群および生理食塩液投与群ではそれぞれ Compound 48/80 および生理食塩液投与 1 時間前に 0.5 w/v%MC 水溶液を経口投与した。試験は各群 10 匹で行った。化合物による Compound 48/80 誘発掻破行動の抑制率は以下の数式で求めた。

数式中、C、D はそれぞれ以下の意味を表す。

C : Compound 48/80 投与群の掻破行動 (scratching behavior) の回数

D : 化合物投与群の掻破行動 (scratching behavior) の回数

$$\text{抑制率 (\%)} = [(C - D) / C] \times 100$$

化合物 1 の結果を第 16 表、化合物 3 の結果を第 17 表に示す。

第16表

| 群               | 搔破回数<br>(回数/60分間) | 抑制率(%) |
|-----------------|-------------------|--------|
| 生理食塩液投与         | 7                 | 54     |
| Compound48/80投与 | 35                |        |
| 化合物1投与          | 16                |        |

第17表

| 群               | 搔破回数<br>(回数/60分間) | 抑制率(%) |
|-----------------|-------------------|--------|
| 生理食塩液投与         | 13                | 52     |
| Compound48/80投与 | 54                |        |
| 化合物3投与          | 26                |        |

第16表に示すように、Compound 48/80 投与群の搔破行動回数は35回で、陰性対照群の搔破行動回数（7回）と比べ増加した。化合物1投与群の搔破行動回数は16回であり、化合物1投与群ではCompound 48/80 投与群の搔破行動回数が54%抑制された。

第17表に示すように、Compound 48/80 投与群の搔破行動回数は54回で、陰性対照群の搔破行動回数（13回）と比べ増加した。化合物3投与群の搔破行動回数は26回であり、化合物3投与群ではCompound 48/80 投与群の搔破行動回数が52%抑制された。

以上の結果から、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質は掻痒治療剤として有用であることが示唆された。

試験例4：ハプテン反復塗布慢性皮膚炎モデルにおける掻痒に対する作用

ハプテン反復塗布慢性皮膚炎モデルの作製は、北垣らの方法「ジャーナル・オブ・インベスティゲイティブ・ダーマトロジー (Journal of Investigative Dermatology)、105 巻、749-755 頁 (1995 年)」を若干改変して行った。

ハプテンとしてオキサゾロン (シグマ・アルドリッチ社製) を用い、これをアセトン (関東化学社製) に溶解して 0.5 w/v%オキサゾロン-アセトン溶液 (抗原溶液) とした。抗原溶液を BALB/c 雄性マウス (6 週齢) の剃毛した吻側背部へ 10  $\mu$ L 塗布して該マウスを感作し、7 日後 (day 0) から、同一部位に 10  $\mu$ L 抗原溶液を 2 日、または 3 日間隔で day 16 まで反復塗布チャレンジし、慢性皮膚炎モデルを作製した。

化合物 1 は、0.5 w/v%MC 水溶液に 10 および 30 mg/mL の濃度でそれぞれ懸濁し、day 16 における抗原溶液塗布 1 時間前に 10 mL/kg を経口投与した。また、コントロール群として 0.5 w/v%MC 水溶液のみを同様に経口投与した群を設けた。

Day 16 におけるマウスの搔痒反応の解析は倉石らの方法「ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー (European Journal of Pharmacology)、275 巻、229-233 頁 (1995 年)」を若干改変して行った。

マウスを新しい環境に適応させるため、アクリル製観察用ケージ (7.5 x 8 x 15 cm) に 1 時間放置した。抗原溶液を吻側背部へ塗布 (Day 16) 後直ちにケージに戻し、8 mm ビデオカメラレコーダーで無人環境下に行動を撮影した。ビデオの再生により、抗原溶液塗布後 1 時間の搔破行動を観察した。後肢による塗布部位およびその周辺への搔破行動の回数を数えた。マウスは約 1 秒間に数回の非常に速い連続した搔破行動を示すが、この一連の行動を 1 回の搔破行動とみなした。

結果を第 18 表に示す。



第 18 表

|                    | コントロール群 | 化合物 1 投与群 (mg/kg) |        |
|--------------------|---------|-------------------|--------|
|                    |         | 100               | 300    |
| ハプテン塗布後 1 時間の搔破行動数 | 264±29  | 138±33**          | 2±1*** |

化合物 1 投与群の搔破行動回数は 100 mg/kg で 138±33 (平均±標準誤差)、300 mg/kg で 2±1 と、コントロール群の搔破行動回数 (264±29) に比べて有意に減少していた (\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 、Dunnett test)。

以上の結果から、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質は搔痒治療剤として有用であることが示唆された。

#### 試験例 5 : マウス皮膚および後根神経節 (DRG) における GPR4 mRNA の発現解析

マウス皮膚および後根神経節 (DRG) における GPR4 mRNA の発現解析は、Reverse Transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により行った。なお、以下の遺伝子実験操作はモレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) に記載されている方法で行った。

(1) プライマーの設定・・・プライマーは、マウス GPR4 (配列番号 14) の 641-660 番目 (センス鎖、配列番号 19) および 943-961 番目 (アンチセンス鎖、配列番号 20) の塩基配列に相当するプライマーを設定し合成した (インビトロジェン社)。

(2) 鋳型 cDNA の作製・・・BALB/c マウスより、背中の皮膚および DRG を摘出した。各組織からの全 RNA の抽出は、guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法にて行った。得られた全 RNA (5  $\mu$ g) を用いて、SUPERScript Preamplification System (Invitrogen 社) により、マニュアルに従って cDNA を作製した。cDNA 作製の際、ゲノムの混入を確認するためにネガティブコントロールとして、Reverse Transcriptase を

添加しないサンプルを作製した[RTase(-)]。

(3) RT-PCR による発現の確認・・・PCR 反応は、サーマルサイクラー PTC-200 (MJ RESEARCH 社)を用いて行った。PCR 反応は、上記 cDNA 1  $\mu$ L、各成分 200  $\mu$ mol/L の dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、10  $\mu$ mol/L のプライマー(配列番号 19 および配列番号 20)、Taq Gold polymerase (PerkinElmer 社) 2.5 単位 および 1 X Taq Gold (Mg plus)バッファーを含む反応溶液 20  $\mu$ L を用い、95℃で 10 分間加熱後、94℃で 1 分、63℃で 30 秒を 1 サイクルとして 28 サイクル行い、さらに 72℃で 5 分間加熱することによって行った。反応終了後、得られた PCR 反応液より 10  $\mu$ L を分取し、2%アガロースゲル [Agarose Nusieve (FMC Bioproduct 社) を Tris-acetate バッファー (40 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L Ethylenediamine tetraacetic acid に溶かして作製)] にて電気泳動した。ゲルを Vistra Green nucleic acid gel stain RPN5787 (Amersham and Molecular Dynamics 社) 10000 倍希釈液にて 30 分間染色し、Fluor Imager (Molecular Dynamics 社)で予想される DNA 断片 (0.32 kb) の増幅を確認した。

その結果、Reverse Transcriptase の非存在時[RTase(-)]には電気泳動後にバンドが検出されず、Reverse Transcriptase の存在時[RTase(+)]時には電気泳動後にバンドが検出されたことから、GPR4 mRNA が皮膚および DRG に発現していることが確認された。

以上の結果からも GPR4 拮抗剤である化合物(I)は、掻痒治療剤として有用であることが示唆された。

GPR4が皮膚に発現していることから、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質は、角化性皮膚疾患、乾癬群(尋常性乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、関節症性乾癬)、魚鱗癬群(尋常性魚鱗癬、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症)、掌跖角化症、毛孔性紅色皰疹・紅斑性角化症、ダリエー病、掌蹼膿疱症、口腔白板症、口腔乳頭腫・口腔扁平苔癬、アミロイド苔癬、天疱瘡群、類天疱瘡、ケロイド等の治療剤として有用であることが示唆される。

一方、GPR4がDRGに発現していることから、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質は、術後や

癌の痛み、頭痛、歯痛、月経痛、耳痛、咽喉痛、外傷痛、症候性神経痛等の治療剤としても有用であることが示唆される。

また、血管内皮に GPR4 が発現している [http://ajpheart.physiology.org/cgi/reprint/00359.2003v1.pdf 参照] ことから、配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質は、低血圧、浮腫、動脈硬化等の治療剤として有用であることが示唆される。

さらに、W002/90925 には、GPR4 拮抗剤を癌の治療に用いることが開示されているので、化合物 (I) は、癌の治療剤としても有用であると考えられる。

本発明に係る医薬は、式 (I) で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩、ならびにそれらの水和物および溶媒和物からなる群から選ばれる物質を有効成分として含むことを特徴とする。本発明に係る医薬としては、有効成分である上記物質をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記の物質と 1 または 2 以上の製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で投与することが望ましい。このような医薬組成物は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。また、医薬組成物の形態である本発明に係る医薬には、他の医薬の有効成分が 1 または 2 以上含まれていてもよい。なお、本発明の医薬は、ヒトを含む哺乳類動物に適用可能である。

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または静脈内投与等の非経口投与のいずれかから治療および／または予防のために最も効果的な投与経路を適宜選択することができる。経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤等を挙げることができ、非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤等を挙げることができる。

錠剤等の固形製剤の製造には、例えば、乳糖、マンニット等の賦形剤；デンプン等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤；脂肪酸エステル等の界面活性剤；グリセリン等の可塑剤を用いることができる。

非経口投与に適する製剤のうち注射剤等の血管内投与用製剤は、好ましくはヒト血液と等張の水性媒体を用いて調製することができる。例えば、注射

剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、塩水とブドウ糖溶液の混合物等から選ばれる水性媒体を用い、常法に従って適当な助剤とともに溶液、懸濁液、または分散液として調製することができる。非経口用の製剤の製造には、例えば、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤等から選択される 1 または 2 以上の製剤用添加物を用いることもできる。

本発明の医薬の投与量および投与頻度は特に限定されず、有効成分である上記物質の種類、投与経路、治療および／または予防の目的、患者の年齢および体重、症状の性質および重篤度等の種々の条件に応じて適宜選択することが可能である。例えば、成人 1 日当り 0.1～100mg/kg を 3～4 回に分けて投与するのが好ましい。しかしながら、これら投与量および投与回数は前述の種々の条件等により変動する。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例、参考例および製剤例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例等により限定されることはない。

下記実施例および参考例中の各化合物の物理化学的データは、以下の機器類によって測定した。

<sup>1</sup>H NMR: JEOL JNM-EX270 (270 MHz) または JEOL JNM-GX270 (270 MHz)

MS: Micromass LCT または Micromass Quattro (APCI 法により測定)

実施例 1: 化合物 1 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(4-メチルピペラジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

特開平 7-61983 に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン (30.0 g, 78.4 mmol) をクロロホルム (300 mL) と酢酸 (300 mL) の混合溶媒に溶解し、1-メチルピペラジン (23.6 g, 236 mmol) およびホルムアルデヒド (37 %水溶液、7.64 g, 94.1 mmol) を加え、60℃に加熱し、18 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、氷冷下に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹

水、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮した。析出した結晶を酢酸エチルでトリチュレーションし、化合物 1 (27.4 g, 55.4 mmol, 収率 71%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  495 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.27 (s, 3 H), 2.45 (m, 8 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.00 (s, 1 H), 6.57-6.66 (m, 2 H), 6.79-7.00 (m, 5 H).

また、対応するフマル酸塩を以下の方法に従って調製した。

上記の化合物 1 (15 g) をメタノール (110 mL) に溶解し、フマル酸 7.0 g (2.0 当量) を加えた。結晶の析出した懸濁液を一旦濃縮乾固し、アセトニトリル (100 mL) を加え懸濁液を 1 時間以上攪拌した。その後、結晶を濾取して、減圧下、乾燥することにより化合物 1 の 2 フマル酸塩を得た (20.1 g, 収率 91%)。

実施例 2 : 化合物 2 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりに 1,2,3,6-テトラヒドロピリジンを用い、実施例 1 と同様にして、特開平 7-61983 に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 20% で化合物 2 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  478 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.04 (m, 2 H), 2.53 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.86-3.02 (m, 6 H), 3.45 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 5.64 (m, 1 H), 5.74 (m, 1 H), 6.02 (s, 1 H), 6.57-6.70 (m, 2 H), 6.78-6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.00 (m, 2 H).

実施例 3 : 化合物 3 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]

ピリジン-3-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにピロリジンを用い、実施例 1 と同様にして、特開平 7-61983 に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 20% で化合物 3 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  466 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.78 (m, 4 H), 2.50 (m, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.50 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.02 (s, 1 H), 6.58-6.66 (m, 2 H), 6.79-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.98-7.02 (m, 2 H).

実施例 4 : 化合物 4 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにモルホリンを用い、実施例 1 と同様にして、特開平 7-61983 に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 46% で化合物 4 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  482 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.43 (m, 4 H), 2.60 (m, 3 H), 2.63 (m, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 3.69 (m, 4 H), 5.34 (s, 2 H), 6.07 (s, 1 H), 6.58-6.67 (m, 2 H), 6.78-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.96-7.01 (m, 2 H).

実施例 5 : 化合物 5 ~ 化合物 12 の合成

特開平 7-61983 に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン (19 mg, 0.050 mmol) をクロロホルム (0.30 mL) と酢酸 (0.30 mL) の混合溶媒に溶解し、対応する  $\text{R}^5\text{R}^6\text{NH}$  のクロロホルム溶液 (1.0 mol/L,

0.15 mL) およびホルムアルデヒド (37 %水溶液、0.005 mL) を加え、60℃ に加熱し、20 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、溶媒を留去し、残渣をクロロホルムに溶解させ、水洗を 2 回施した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣にクロロホルム (0.50 mL) および N-メチルイサト酸無水物 ポリスチレン (N-Methylisatoic anhydride polystyrene、ノババイオケム社製、0.15 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物中のレジンを選択し、残渣をイオン交換クロマトグラフィー (ボンデシル SCX、バリアン社製、2 mol/L アンモニア-メタノール溶液で溶出) で精製し、目的物である化合物 5 ~ 化合物 12 を得た。

化合物の構造を第 1 表に、分析値 (APCI-MS) を第 14 表に記した。

実施例 6 : 化合物 13 {ヨウ化 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-1-メチルピロリジニウム} の合成

実施例 3 で得られた化合物 3 (11.4 g, 24.5 mmol) をジクロロメタン (200 mL) に溶解し、ヨウ化メチル (1.98 mL, 31.8 mmol) を加え、室温で 10 時間攪拌した。反応溶液を減圧下、濃縮した後、酢酸エチルを加えた。得られた懸濁液を 60℃ に加熱し 0.5 時間攪拌し、その後室温で 1 時間攪拌した。析出した固体を濾取して、化合物 13 (13.7 g, 22.5 mmol, 収率 92%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  480 ( $[M - I]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.13 (br s, 2 H), 2.25 (br s, 2 H), 2.58 (s, 3 H), 2.62 (s, 2 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.85 (m, 4 H), 3.06 (s, 3 H), 3.52 (br s, 2 H), 3.83 (br s, 2 H), 4.74 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 6.76 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.18 (m, 4 H), 7.43 (s, 1 H).

実施例 7 : 化合物 14 {2-(2,5-ジヒドロピロール-1-イルメチル)-8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

1-メチルピペラジンの代わりに 2,5-ジヒドロピロールを用い、実施例 1 と同様にして、特開平 7-61983 号に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 82%で化合物 14 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  464 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.59 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.9-3.1 (m, 4 H), 3.45 (s, 4 H), 3.70 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 5.87 (s, 2 H), 6.07 (s, 1 H), 6.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H), 6.63 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2 H), 6.75-6.85 (m, 2H), 6.88 (s, 1 H), 7.00-7.05 (m, 2 H).

実施例 8 : 化合物 15 <N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ)酢酸メチルエステル>の合成

1-メチルピペラジンの代わりにサルコシンメチルエステル塩酸塩を用い、実施例 1 と同様にして、特開平 7-61983 号に記載された 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 31%で化合物 15 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  498 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.36 (s, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.23 (s, 2 H), 3.53 (s, 2 H), 3.70 (s, 3 H), 5.34 (s, 2 H), 5.98 (s, 1 H), 6.59-6.67 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.97-7.02 (m, 2 H).

実施例 9 : 化合物 16 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステル} の合成

1-メチルピペラジンの代わりにイソニペコチン酸エチルエステルを用い、実施例 1 と同様にして、特開平 7-61983 号に記載された 2-(2-エチル-



5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンから収率 60%で化合物 16 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  552 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3 H), 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.68-1.90 (m, 6 H), 1.97 (td,  $J = 11.3, 2.7$  Hz, 2 H), 2.26 (m, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.83 (m, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.36 (s, 2 H), 4.11 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 6.03 (s, 1 H), 6.57-6.66 (m, 2 H), 6.78-6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.94-6.99 (m, 2 H).

実施例 10 : 化合物 17 <2- {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ}エタノール>の合成

水素化アルミニウムリチウム (15.7 mg, 0.38 mmol) をテトラヒドロフラン (0.3 mL) に懸濁させ、氷冷下、攪拌しながら、テトラヒドロフラン (0.9 mL) に溶解した、実施例 8 で得られた化合物 15 (126 mg, 0.253 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、攪拌しながら水 (0.016 mL)、2mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (0.016 mL)、水 (0.048 mL) を順次滴下した。析出物を濾過し、濾液を濃縮した残渣を NH-シリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル) で精製して化合物 17 (47.6 mg, 0.101 mmol, 収率 40%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  470 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.7 (br s, 1 H), 2.21 (s, 3 H), 2.57 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.44 (s, 2 H), 3.61 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 5.99 (s, 1 H), 6.59-6.67 (m, 2 H), 6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.91-6.98 (m, 2 H).

実施例 11 : 化合物 18 <1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ

[b, f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-イル}メタノール>の合成

化合物 15 の代わりに化合物 16 を用い、実施例 10 と同様にして、収率 50% で化合物 18 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  510 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.24-1.74 (m, 6 H), 1.91 (m, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.86-3.02 (m, 6 H), 3.37 (s, 2 H), 3.48 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 5.98 (s, 1 H), 6.58-6.67 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 6.94-7.00 (m, 2 H).

実施例 12: 化合物 19 <{N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ}酢酸>の合成

実施例 8 で得られた化合物 15 (151 mg, 0.303 mmol) をメタノール (3.0 mL) に溶解し、1mol/L 水酸化ナトリウム/メタノール溶液 (1.5 mL) を加え、60°C に加熱し、9 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、室温に冷却し、4mol/L 塩酸を加え、pH を 6.0 に調整した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥した。この結晶をエチルエーテルに懸濁させ、加熱還流条件下、1 時間攪拌し、さらに室温で 1 時間攪拌した。結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ化合物 19 (119 mg, 0.246 mmol, 収率 81%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  483 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 2.48-2.52 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.89 (m, 4 H), 3.11 (s, 2 H), 3.66 (s, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 6.75-7.02 (m, 7 H), 8.36 (s, 1 H).

実施例 13: 化合物 20 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸} の合成

化合物 15 の代わりに化合物 16 を用い、実施例 12 と同様にして、収率 70% で化合物 20 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  524 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.52 (m, 2 H), 1.75 (m, 2 H), 1.97 (m, 2 H), 2.18 (m, 1 H), 2.48-2.54 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.71-2.92 (m, 8 H), 3.32 (s, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 6.75-6.94 (m, 7 H), 8.23 (s, 1 H).

実施例 14: 化合物 21 <N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチルアミノ}アセトニトリル>の合成

実施例 6 で得られた化合物 13 (700 mg, 1.15 mmol) をクロロホルム (1.2 mL) に溶解し、メチルアミノアセトニトリル (368 mg, 3.46 mmol) およびトリエチルアミン (0.561 mL, 4.03 mmol) を加えて加熱還流条件下、終夜撹拌した。反応液を室温まで冷却し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム = 1/99) で精製した。目的物を含む画分の濃縮残渣にエタノールを加え、得られた懸濁液を 60°C で 0.5 時間撹拌し、その後室温で 1 時間撹拌した。析出した結晶を濾別し、減圧下で乾燥させることにより、化合物 21 (415 mg, 0.893 mmol, 収率 78%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  465 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.42 (s, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.43 (s, 2 H), 3.48 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.10 (s, 1 H), 6.58-6.69 (m, 2 H), 6.78-6.83 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.02 (m, 2 H).

実施例 15: 化合物 22 {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ

[b, f]アゼピン-2-イルメチル}-N-[2-(ピロリジン-1-イル)エチル]アミン・2フマル酸塩} の合成

#### 工程 1

後記の実施例 24 で得られた化合物 93 (1.25 g, 3.03 mmol) をクロロホルム (54 mL) およびアセトン (6 mL) の混合溶媒に溶解し、二酸化マンガ (2.7 g, 31 mmol) を加えて室温で終夜攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、固形物をセライトを通じて濾別し、濾液を濃縮した。残渣に酢酸エチルを加えて得られる懸濁液を加熱還流条件下 0.5 時間攪拌し、その後室温に冷却してさらに 0.5 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥させることにより 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (1.02 g, 2.48 mmol, 収率 82%) を得た。

APCI-MS: m/z 411 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.64 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 2 H), 3.06 (m, 2 H), 5.37 (s, 2 H), 6.60-6.91 (m, 6 H), 7.52-7.61 (m, 2 H), 9.77 (s, 1 H).

#### 工程 2

工程 1 で得られた 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (0.300 g, 0.73 mmol) をテトラヒドロフラン (10 mL) およびクロロホルム (6 mL) の混合溶媒に懸濁させ、これに 2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミン (139  $\mu\text{L}$ , 1.10 mmol) を加えて 10 分間、加熱還流した。その後、反応溶液を室温まで冷却してトリアセトキシホウ素化ナトリウム (464 mg, 2.19 mmol) を加えて 12 時間、室温で攪拌した。反応溶液に酢酸エチルと 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を加え、有機層を無水硫酸マグネシウムを加えて乾燥させた。その後、溶液を減圧下、濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム/2mol/L アンモニア・メタノール溶液=20/1) で精製して、N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒ

ドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-イルメチル]-N-[2-(ピロリジン-1-イル)エチル]アミン (0.301 g, 0.592 mmol, 収率 81%) を得た。これを実施例 1 と同様な方法でフマル酸塩として化合物 22 を得た。

APCI-MS: m/z 509 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.65-1.85 (m, 4 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.6-2.7 (m, 4 H), 2.7-3.0 (m, 8 H), 3.86 (s, 2 H), 5.29 (s, 2 H), 6.55 (s, 4 H), 6.75-6.95 (m, 6 H), 7.0-7.15 (m, 2 H), 8.43 (s, 1 H).

実施例 16: 化合物 23 {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-イルメチル]-N-(2-メトキシエチル)アミン・1 フマル酸塩} の合成

2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミンの代わりに 2-メトキシエチルアミンを用い、実施例 15 の工程 2 と同様にして、収率 78% で N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-イルメチル]-N-(2-メトキシエチル)アミンを得た。これを実施例 1 と同様な方法でフマル酸塩として化合物 23 を得た。

APCI-MS: m/z 470 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.80 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.8-3.0 (m, 6 H), 3.24 (s, 3 H), 3.49 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2 H), 3.80 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.48 (s, 2 H), 6.84 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.85-7.0 (m, 4 H), 7.0-7.1 (m, 2 H), 8.43 (s, 1 H).

実施例 17: 化合物 24 <2- {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-イルメチル]} アミノエタノール・0.5 フマル酸塩> の合成

2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミンの代わりに2-エタノールアミンを用い、実施例15の工程2と同様にして、収率39%で2-{[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]アミノ}エタノールを得た。

これを実施例1と同様な方法でフマル酸塩として化合物24を得た。

APCI-MS:  $m/z$  456 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.70-2.75 (m, 2 H), 2.77 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.85-2.9 (m, 4 H), 3.55 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2 H), 3.78 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.44 (s, 1 H), 6.79 (dd,  $J = 1.5$  Hz, 8.3 Hz, 1 H), 6.85-6.95 (m, 4 H), 7.0-7.1 (m, 2 H), 8.39 (s, 1 H).

実施例18: 化合物25 <{[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]メチル}アミン・1フマル酸塩>の合成

実施例6で得られた化合物13 (0.300 g, 0.516 mmol) を 7mol/L アンモニアメタノール溶液 (5 mL) に溶解し、封管して 80°C で 48 時間加熱した。その後、反応溶液を減圧下、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム/2mol/L アンモニア・メタノール溶液=20/1) で精製して、{[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]メチル}アミン (0.135 g, 0.329 mmol, 収率 64%) を得た。

これを実施例1と同様な方法でフマル酸塩として化合物25を得た。

APCI-MS:  $m/z$  412 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.77 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.85-2.9 (m, 4 H), 3.81 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.42 (s, 2 H), 6.8-7.0 (m, 5 H), 7.0-7.15 (m, 2 H), 8.46 (s, 1 H).

実施例 19 : 化合物 26 {N-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-N-メチル-N-(2H-テトラゾール-5-イルメチル)アミン} の合成

実施例 6 で得られた化合物 13 (667 mg, 1.10 mmol) をクロロホルム (11 mL) に溶解し、参考例 1a で得られた N-メチル-N-(2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメチル)アミン (390 mg, 1.10 mmol) およびトリエチルアミン (0.31 mL, 2.3 mmol) を加えて 60°C で終夜撹拌した。反応液を室温まで冷却し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲル (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム=2/98) に通じて原点成分を除去し、濃縮した。残渣にアセトン (1.9 mL)、水 (1.9 mL)、酢酸 (1.9 mL) を加え、60°C で 1.5 時間撹拌した。反応液を 0°C まで冷却し、析出物を濾過し、濾液を濃縮して得られた残渣をエタノールから再結晶して、化合物 26 (66.7 mg, 0.131 mmol, 収率 12%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  508 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.32 (t,  $J = 5.0$  Hz, 3 H), 2.58 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.75-2.79 (m, 7 H), 2.81 (q,  $J = 5.0$  Hz, 2 H), 4.08 (s, 2 H), 4.28 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.37 (s, 1 H), 6.46 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.58 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.72-6.80 (m, 2 H), 6.84-6.94 (m, 3 H).

実施例 20 : 化合物 27 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-[4-(2H-テトラゾール-5-イル)-ピペリジン-1-イルメチル]-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メチルアミノアセトニトリルの代わりにピペリジン-4-カルボニトリルを用い、実施例 14 と同様にして、収率 58% で 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボニトリルを得た。

得られた 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボニトリル (0.252 g, 0.500 mmol) をトルエン (4 mL) に溶解し、トリメチルシリルアジド (0.13 mL, 1.00 mmol) および酸化ジブチルスズ (12.4 mg, 0.05 mmol) を加え、110°C で 22 時間、加熱攪拌した。反応溶液を減圧下、濃縮した後、残渣にエタノールを加えた。得られた懸濁液を 0.5 時間、加熱環流した後、固体を濾取して化合物 27 (0.110 g, 0.200 mmol, 収率 40%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  548 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.22 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.65-1.85 (m, 2 H), 1.9-2.05 (m, 2 H), 2.2-2.35 (m, 2 H), 2.48 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.77 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.85-3.05 (m, 7 H), 3.52 (s, 2H), 5.29 (s, 2 H), 6.85-7.05 (m, 8 H), 8.36 (s, 1 H).

## 実施例 21 : 化合物 28 ~ 化合物 90 の合成

### 工程 1

ヨウ化 1-(10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (0.015 g, 0.050 mmol) をジメチルホルムアミド (0.50 mL) に溶解し、対応する YH (式中、Y は前記と同義である) のクロロホルム溶液 (1.0 mmol/L, 0.060 mL) および水酸化リチウム・1水和物 (0.070 g) を加え、室温で 20 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、溶媒を留去し、残渣をジクロロメタンに溶解させ、得られた溶液を水で 3 回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮し、残渣にクロロホルム (0.60 mL) および N-メチルイサト酸無水物 ポリスチレン (N-Methylisatoic anhydride polystyrene、ノババイオケム社製、0.15 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物中のレジンを濾別し、濾液を濃縮した後に、残渣をイオン交換クロマトグラフィー (ボンデシル SCX、バリアン社製、2 mol/L アンモニア-メタノール溶液で溶出) で精製し、製造法 1 における化合物 (IV) に相当する各種中間体を得た。

### 工程 2



実施例 5 と同様にして、工程 1 で得られた製造法 1 における化合物 (IV) に相当する各種中間体と相当する  $R^5R^6NH$  (式中、 $R^5$  および  $R^6$  はそれぞれ前記と同義である) から、目的物である化合物 28 ~ 化合物 90 を得た。尚、化合物 41、42、48、89 はシュウ酸塩として単離した。

化合物 28 ~ 化合物 87 の構造と分析値 (APCI-MS) を第 2 表 ~ 第 6 表に記した。また、化合物 29、30、36、41、42、48、53、54、60、65、66、72、77、78、84 の分析値 ( $^1H$  NMR) を以下に示した。

化合物 29 {2-(ベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.44 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 2.75-2.85 (m, 2 H), 2.9-3.0 (m, 4 H), 3.32 (s, 2 H), 5.31 (s, 2 H), 5.5-5.8 (m, 2 H), 6.8-7.1 (m, 6 H), 7.1-7.3 (m, 2 H), 7.56 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1 H), 7.62 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.35 (s, 1 H).

化合物 30 {2-(ベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.5-1.7 (m, 4 H), 2.3-2.5 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.39 (s, 2 H), 5.31 (s, 2 H), 6.8-6.95 (m, 4 H), 6.95-7.0 (m, 2 H), 7.1-7.3 (m, 2 H), 7.55 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H), 7.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 8.26 (s, 1 H), 8.34 (s, 1 H).

化合物 36 {2-(ベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.27 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.30 (s, 2 H), 6.7-7.1 (m, 6 H), 7.1-7.25 (m, 2 H), 7.54 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 7.62 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.34 (s, 1 H).

化合物 4 1 {2-(2-フェニルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1 シュウ酸塩}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.5 (m, 2 H), 2.7-3.0 (m, 4 H), 3.0-3.2 (m, 2 H), 3.4-3.6 (m, 2 H), 4.05 (s, 2 H), 5.45 (s, 2 H), 5.69 (m, 1 H), 5.85 (m, 1 H), 6.6-6.8 (m, 2 H), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1 H), 6.97 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 7.05-7.2 (m, 2 H), 7.2-7.5 (m, 2 H), 7.5-7.7 (m, 4 H), 7.7-7.85 (m, 3 H), 8.54 (s, 1 H).

化合物 4 2 {2-(2-フェニルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1 シュウ酸塩}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.8-2.0 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.0-3.2 (m, 4 H), 4.12 (s, 2 H), 5.45 (s, 2 H), 6.6-6.7 (m, 2 H), 6.88 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.96 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.2-7.3 (m, 2 H), 7.4-7.6 (m, 4 H), 7.6-7.8 (m, 3 H), 8.53 (s, 1 H).

化合物 4 8 {2-モルホリノメチル-8-(2-フェニルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1 シュウ酸塩}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.7-3.0 (m, 8 H), 3.6-3.8 (m, 4 H), 3.83 (s, 2 H), 5.42 (s, 2 H), 6.65-6.7 (m, 2 H), 6.85 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H), 6.92 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 7.0-7.1 (m, 2 H), 7.2-7.3 (m, 2 H), 7.4-7.6 (m, 4 H), 7.65-7.8 (m, 3 H), 8.44 (s, 1 H).

化合物 5 3 {2-(2-メチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.45 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2 H),

2.54 (s, 3 H), 2.75-2.85 (m, 2 H), 2.85-3.0 (m, 4 H), 3.35 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 5.55-5.75 (m, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.4-7.6 (m, 2 H), 8.28 (s, 1 H).

化合物 54 {2-(2-メチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.5-1.8 (m, 4 H), 2.3-2.5 (m, 4 H), 2.54 (s, 3 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.39 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.7-6.9 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.3-7.5 (m, 2 H), 8.25 (s, 1 H).

化合物 60 {2-(2-メチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.4 (m, 4 H), 2.49 (s, 3 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.28 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.28 (s, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.5-7.6 (m, 2 H), 8.28 (s, 1 H).

化合物 65 {2-(5,6-ジメチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.2-2.4 (m, 6 H), 2.45 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2 H), 2.75-2.85 (m, 2 H), 2.85-3.05 (m, 4 H), 3.30 (s, 2 H), 5.24 (s, 2 H), 5.6-5.7 (m, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.31 (s, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 8.17 (s, 1 H), 8.27 (s, 1 H).

化合物 66 {2-(5,6-ジメチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.5-1.8 (m, 4 H), 2.27 (s, 3 H), 2.28 (s, 3 H), 2.3-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.39 (s, 2 H), 5.24 (s, 2 H), 6.8-7.0

(m, 6 H), 7.30 (s, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 8.16 (s, 1 H), 8.24 (s, 1 H).

化合物 7 2 {2-(5,6-ジメチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-  
-モルホリノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.4 (m, 10 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.28 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.24 (s, 2 H), 6.8-7.0 (m, 6 H), 7.30 (s, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 8.16 (s, 1 H), 8.28 (s, 1 H).

化合物 7 7 {2-(2-エチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-  
(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-  
-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.95-2.05 (m, 2 H), 2.43 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2 H), 2.6-3.0 (m, 8 H), 3.32 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 5.1-5.5 (m, 2 H), 6.75-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.25 (m, 2 H), 7.47 (m, 1 H), 7.55 (m, 1 H), 8.26 (s, 1 H).

化合物 7 8 {2-(2-エチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-(ピ  
ロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピ  
ン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.6-1.8 (m, 4 H), 2.3-2.4 (m, 4H), 2.8-3.0 (m, 6 H), 3.32 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.7-7.0 (m, 6 H), 7.0-7.2 (m, 2 H), 7.46 (m, 1 H), 7.54 (m, 1 H), 8.23 (s, 1 H).

化合物 8 4 {2-(2-エチルベンゾイミダゾール-1-イルメチル)-8-モルホリ  
ノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.2-2.4 (m, 4 H), 2.8-3.0 (m, 6H), 3.27 (s, 2 H), 3.5-3.6 (m, 4 H), 5.27 (s, 2 H), 6.7-7.0 (m, 6 H), 7.1-7.2 (m, 2 H), 7.47 (m, 1 H), 7.55 (m, 1 H), 8.26 (s, 1 H).

化合物 88 ~ 化合物 90 の構造を第 7 表に、分析値 (APCI-MS、 $^1\text{H}$  NMR) を以下に示した。

化合物 88 {2-(イミダゾ[4,5-b]ピリジン-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.0-2.1 (m, 2 H), 2.44 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2 H), 2.75-2.8 (m, 2 H), 2.8-3.0 (m, 4 H), 3.30 (s, 2H), 5.33 (s, 2 H), 5.5-5.6 (m, 2 H), 6.8-7.0 (m, 4 H), 7.0-7.05 (m, 2 H), 7.27 (dd,  $J = 4.7$  Hz, 8.0 Hz, 1 H), 8.06 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H), 8.27 (s, 1 H), 8.37 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1 H), 8.54 (s, 1 H).

化合物 89 {2-(イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1 シュウ酸塩}

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2.2-2.3 (m, 2 H), 2.9-3.0 (m, 4 H), 3.4-3.5 (m, 2 H), 3.60 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2 H), 4.05 (s, 2 H), 5.37 (s, 2 H), 5.67 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1 H), 5.85 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1 H), 6.9-7.0 (m, 2 H), 7.0-7.1 (m, 4 H), 7.25 (dd,  $J = 5.4, 8.1$  Hz, 1 H), 8.01 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 8.40 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1 H), 8.55 (s, 1 H), 8.62 (s, 1 H).

化合物 90 {2-(イミダゾ[4,5-c]ピリジン-1-イルメチル)-8-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン}

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.1-2.2 (m, 2 H), 2.56 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 2.8-2.9 (m, 2 H), 3.0-3.1 (m, 4 H), 3.48 (s, 2H), 5.30 (s, 2 H), 5.67 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1 H), 5.73 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1 H), 6.08 (s, 1 H), 6.65-6.75 (m,

2 H), 6.95-7.0 (m, 2 H), 7.0-7.05 (m, 2 H), 7.71 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 8.45 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1 H), 8.78 (s, 1 H).

実施例 22 : 化合物 125 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]酢酸 } の合成

実施例 36 で得られた化合物 105 を用い、実施例 52 の工程 1 と同様にして、収率 94% で [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]アセトニトリルを得た。

これを用い、実施例 38 と同様にして収率 86% で化合物 125 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  455 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3 H), 2.49 (s, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.75 (q,  $J = 7.3$  Hz, 2 H), 2.9-3.1 (m, 4 H), 3.19 (s, 3 H), 3.42 (s, 2 H), 5.32 (s, 2 H), 6.81 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.9-7.05 (m, 6 H).

実施例 23 : 化合物 92 { 酢酸 [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]エステル } の合成

実施例 6 で得られた化合物 13 (7.98 g, 13.1 mmol) をジメチルスルホキシド (87 mL) に溶解し、酢酸リチウム (4.33 g, 65.7 mL) を加えて 70°C で 2 日間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、水 (3 回)、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル) で精製し、目的物を含む画分を濃縮し、残渣にエタノールを加えて得られる懸濁液を室温で 0.5 時間攪拌した。析出した結晶を濾取して化合物 92 (2.87 g, 6.31 mmol, 収率 48%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  455 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.06 (s, 3 H), 2.60

(s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.98 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.13 (s, 1 H), 6.58-6.83 (m, 4 H), 6.88 (s, 1 H), 7.01-7.07 (m, 2 H).

実施例 24 : 化合物 93 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]メタノール } の合成

実施例 23 で得られた化合物 92 (2.79 g, 6.14 mmol) をテトラヒドロフラン (61 mL) に懸濁させ、ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (28%, 6.2 mL, 31 mmol) を加えて室温で 3.5 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、反応液に水を加えて室温にて 0.5 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥させた後にエタノールに懸濁させ、加熱還流条件下、1 時間攪拌し、さらに室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 93 (2.04 g, 4.95 mmol, 収率 81%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  413 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.56 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.55 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.03 (s, 1 H), 6.59-6.85 (m, 3 H), 6.88 (s, 1 H), 7.03 (m, 2 H).

実施例 25 : 化合物 94 { 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-メトキシメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン } の合成

水素化ナトリウム (55%, 11 mg, 0.25 mmol) のテトラヒドロフラン (0.40 mL) 懸濁液にメタノール (20  $\mu\text{L}$ , 0.50 mmol) を加えて室温で 20 分間攪拌した。その後、反応液をテトラヒドロフラン (0.20 mL) に懸濁した実施例 6 で得られた化合物 13 (30 mg, 0.050 mmol) に加え、60°C で 3.5 時間反応させた。反応液を濃縮した後、残渣をクロロホルムに溶解し、得られた溶液を水と飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮し

た。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン＝45/50/5）で精製して化合物 9 4（6.5 mg, 15 mmol, 収率 30%）を得た。

APCI-MS:  $m/z$  427 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.36 (s, 3 H), 4.32 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.09 (s, 1 H), 6.58-6.82 (m, 4 H), 6.88 (s, 1 H), 7.01 (m, 2 H).

実施例 2 6 : 化合物 9 5 {2-アリルオキシメチル-8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにアリルアルコールを用い、実施例 2 5 と同様にして、収率 34% で化合物 9 5 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  453 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.00 (dt,  $J = 5.6, 1.5$  Hz, 2 H), 4.39 (s, 2 H), 5.19 (dq,  $J = 10.2, 1.5$  Hz, 1 H), 5.29 (dq,  $J = 17.0, 1.5$  Hz, 1 H), 5.34 (s, 2 H), 5.95 (m, 1 H), 6.10 (s, 1 H), 6.58-6.83 (m, 4 H), 6.88 (s, 1 H), 7.03 (m, 2 H).

実施例 2 7 : 化合物 9 6 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2-メトキシエトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに 2-メトキシエタノールを用い、実施例 2 5 と同様にして、収率 9.3% で化合物 9 6 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  495 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.38 (s, 3 H), 3.57 (m, 4 H), 4.44 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.62 (d,  $J = 8.6$



Hz, 1 H), 6.67 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.00–7.06 (m, 2 H).

実施例 28 : 化合物 97 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2,2,2-トリフルオロエトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに 2,2,2-トリフルオロエタノールを用い、実施例 25 と同様にして、収率 64% で化合物 97 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  495 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.78 (q,  $J = 8.7$  Hz, 2 H), 4.54 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.24 (s, 1 H), 6.60 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 6.71 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.76–6.82 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 6.98–7.04 (m, 2 H).

実施例 29 : 化合物 98 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2-メチルプロポキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに 2-メチル-1-プロパノールを用い、実施例 25 と同様にして、収率 11% で化合物 98 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  469 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.91 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6 H), 1.30 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.89 (m, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.20 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2 H), 4.37 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.60 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1 H), 6.67 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1 H), 6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.98–7.05 (m, 2 H).

実施例 30 : 化合物 99 {2-ベンジルオキシメチル-8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにベンジルアルコールを用い、実施例 25 と同様にして、収率 78% で化合物 99 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  503 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 2 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 4.42 (s, 2 H), 4.53 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 6.20 (s, 1 H), 6.59 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.69 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.78 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.02 (m, 2 H), 7.26–7.36 (m, 5 H).

実施例 31: 化合物 100 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2-フェニルエトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりに 2-フェニルエタノールを用い、実施例 25 と同様にして、収率 38% で化合物 100 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  517 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.91 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 3.66 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2 H), 4.39 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.08 (s, 1 H), 6.60 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1 H), 6.66 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.80 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.94–7.01 (m, 2 H), 7.19–7.30 (m, 5 H).

実施例 32: 化合物 101 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(ピリジン-2-イルメトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにピリジン-2-イルメタノールを用い、実施例 25 と同様にして、収率 65% で化合物 101 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  504 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 4.52 (s, 2 H), 4.66 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.25 (s, 1 H), 6.60 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.70

(d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.76-6.81 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.03-7.08 (m, 2 H), 7.18 (br dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1 H), 7.47 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 7.68 (td,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1 H), 8.54 (br d,  $J = 4.8$  Hz, 1 H).

実施例 33 : 化合物 102 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(フラン-2-イルメトキシメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

メタノールの代わりにフラン-2-イルメタノールを用い、実施例 25 と同様にして、収率 77% で化合物 102 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  493 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 4.41 (s, 2 H), 4.45 (s, 2 H), 5.33 (s, 2 H), 6.21 (br s, 1 H), 6.31 (dd,  $J = 3.1, 0.8$  Hz, 1 H), 6.33 (dd,  $J = 3.1, 1.8$  Hz, 1 H), 6.58 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 6.69 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1 H), 6.75-6.80 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 7.00-7.04 (m, 2 H), 7.40 (dd,  $J = 1.8, 0.8$  Hz, 1 H).

実施例 34 : 化合物 103 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボニトリル} の合成

実施例 15 の工程 1 で得られた 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド (650 mg, 1.58 mmol) をアセトニトリル (16 mL) に懸濁させ、ヒドロキシルアミン塩酸塩 (153 mg, 2.38 mmol)、トリエチルアミン (0.331 mL, 2.38 mmol) およびフタル酸無水物 (328 mg, 2.21 mmol) を加えて 80°C で終夜攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をクロロホルムに溶解し、得られた溶液をアンモニア水 (3%) と飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム = 1/99) で精製し、目的物を含む画分を濃縮して残渣にエタノールを加え、得られた懸濁液を

60℃で0.5時間攪拌し、室温で1時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥して化合物103 (440 mg, 1.08 mmol, 収率 68%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  408 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 5.36 (s, 2 H), 6.48 (s, 1 H), 6.63-6.90 (m, 5 H), 7.28-7.33 (m, 2 H).

実施例 35: 化合物 104 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2H-テトラゾール-5-イル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

実施例 34 で得られた化合物 103 を用い、実施例 20 の後段と同様にして収率 72% で化合物 104 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  451 ( $[M + H]^+$ )

APCI-MS:  $m/z$  451 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.24 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.48-2.53 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.80 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.86-3.02 (m, 4 H), 5.32 (s, 2 H), 6.83 (dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, 1 H), 6.91-6.98 (m, 3 H), 7.10 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1 H), 7.65-7.70 (m, 2 H), 8.20 (s, 1 H).

実施例 36: 化合物 105 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]アセトニトリル } の合成

実施例 6 で得られた化合物 13 (2.04 g, 3.36 mmol) をジメチルホルムアミド (17 mL) に溶解して、青酸ナトリウム (361 mg, 7.37 mmol) を加え、50℃で10時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、酢酸エチルで希釈し、2mol/L 水酸化ナトリウム水溶液、水 (2回)、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をエタノールから再結晶し、目的物である化合物 105 (751 mg, 1.78 mmol, 収率 53%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  422 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63

(s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.62 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.59-6.71 (m, 2 H), 6.80-6.84 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.95-7.01 (m, 2 H).

実施例 37 : 化合物 106 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-8-(2H-テトラゾール-5-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

実施例 36 で得られた化合物 105 を用い、実施例 20 の後段と同様にして、収率 76% で化合物 106 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  465 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.22 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.48-2.52 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.86 (m, 4 H), 4.11 (s, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.75-6.94 (m, 7 H), 8.32 (br s, 1 H).

実施例 38 : 化合物 107 {[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル]酢酸} の合成

実施例 36 で得られた化合物 105 (247 mg, 0.586 mmol) をエタノール (12 mL) に懸濁し、水酸化ナトリウム (938 mg, 23.5 mmol) を加えて、加熱還流条件下、3 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後に、反応液を室温まで冷却し、1mol/L 塩酸で pH 5 に調整した。析出した結晶を濾過し、減圧下乾燥した後、エタノールに懸濁し、60°C で 0.5 時間攪拌し、室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下乾燥して化合物 107 (122 mg, 0.243 mmol, 収率 41%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  441 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.48-2.53 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.87 (br s, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 5.38 (s, 2 H), 6.74-6.94 (m, 7 H), 8.27 (s, 1 H), 12.15 (br s, 1 H).

実施例 39 : 化合物 108 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチルスルファニル]酢酸メチルエステル } の合成

実施例 6 で得られた化合物 13 (1.04 g, 1.71 mmol) をクロロホルム (17 mL) に溶解して、メルカプト酢酸メチルエステル (0.199 mL, 2.23 mmol) および 1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデック-7-エン (0.384 mL, 2.57 mmol) を加え、40℃で 7 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出溶媒:メタノール/クロロホルム=1/99)で精製し、化合物を含む画分を濃縮した。残渣にエタノールを加え、得られた懸濁液を 60℃で 0.5 時間、室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取して、化合物 108 (628 mg, 1.25 mmol, 収率 73%) を得た。

APCI-MS: m/z 501 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.09 (s, 2 H), 3.72 (s, 3 H), 3.73 (s, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.01 (s, 1 H), 6.59-6.67 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 6.88 (s, 1 H), 6.96-7.03 (m, 2 H)

実施例 40 : 化合物 109 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチルスルファニル]酢酸 } の合成

実施例 39 で得られた化合物 108 (350 mg, 0.699 mmol) を用い、実施例 12 と同様にして、収率 38% で化合物 109 を得た。

APCI-MS: m/z 487 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.16 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.42-2.50 (s x 2, 6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.81 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.88 (m, 6 H), 3.49 (s, 2 H), 5.22 (s, 2 H), 6.67-6.89 (m, 7 H), 8.18 (s, 1 H).

実施例 41 : 化合物 110 { 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル } の合成

## 工程 1

ヨウ化 1- (10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ [b, f]アゼピン-2-イルメチル) -1-メチルピペリジニウム (6.68 g, 15.4 mmol) をジメチルスルホキシド (110 mL) に溶解し、酢酸リチウム (5.07 g, 76.9 mmol) を加えて、70°C で 2 日間撹拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、水 (3 回) と飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=30/70) で精製して、酢酸 (10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ [b, f]アゼピン-2-イルメチル) エステル (2.85 g, 10.7 mmol, 収率 69%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  268 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.07 (s, 3 H), 3.07 (br s, 4 H), 4.99 (s, 2 H), 6.05 (br s, 1 H), 6.66-6.85 (m, 3 H), 7.02-7.11 (m, 4 H).

## 工程 2

工程 1 で得られた酢酸 (10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ [b, f]アゼピン-2-イルメチル) エステル (2.85 g, 10.7 mmol) をメタノール (110 mL) に懸濁して、ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 (38%, 1.14 mL, 5.36 mmol) を加え、室温で 1 時間撹拌した。反応溶液を濃縮し、残渣に飽和食塩水とクロロホルムを加えて 3 回クロロホルムで抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をジイソプロピルエーテルから再結晶して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ [b, f]アゼピン-2-イルメタノール (1.73 g, 7.68 mmol, 収率 72%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  226 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.49 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1 H), 3.08 (br s, 4 H), 4.57 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2 H), 6.02 (br s, 1 H), 6.66-6.87 (m, 3 H), 7.02-7.11 (m, 4 H).

## 工程 3

工程 2 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ [b, f]アゼピン-2-イルメタノール (6.1 g, 70 mmol) をクロロホルム (77 mL) に溶解して、二酸化マンガンを (4.55 g, 46.1 mmol) を加え、室温で 8 時間撹拌した。反応溶液をセライトを通じて濾過し、濾液を濃縮した。残渣をシリカゲルクロマ

トグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチル/ヘキサン＝20/80）で精製して 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド（1.15 g, 5.15 mmol, 収率 67%）を得た。

APCI-MS:  $m/z$  224 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.11 (m, 4 H), 6.49 (br s, 1 H), 6.87-6.91 (m, 3 H), 7.07-7.17 (m, 2 H), 7.55-7.62 (m, 2 H), 9.88 (s, 1 H).

#### 工程 4

工程 3 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボアルデヒド（665 mg, 2.98 mmol）をアセトニトリル（18 mL）および水（18 mL）の混合溶媒に溶解して、ジメチルスルホキシド（2.1 mL, 30 mmol）、リン酸 2 水素ナトリウム（1.43 g, 11.9 mmol）および亜塩素酸ナトリウム（404 mg, 4.47 mmol）を加え、50℃で 4 時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチルと水を加え、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせ、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣に酢酸エチルとヘキサンの混合溶媒（3 : 1）を加えて得られる懸濁液を 60℃で 0.5 時間攪拌し、室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾過して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸（598 mg, 2.50 mmol, 収率 84%）を得た。

APCI-MS:  $m/z$  240 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.11 (m, 4 H), 6.39 (br s, 1 H), 6.77-6.80 (m, 3 H), 7.06-7.16 (m, 2 H), 7.79-7.84 (m, 2 H).

#### 工程 5

工程 4 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸（426 mg, 1.78 mmol）をエタノール（8.9 mL）に溶解して、塩化チオニル（0.26 mL, 3.6 mmol）を加え、加熱還流条件下 5 時間攪拌した。反応溶液を濃縮し、クロロホルムと飽和重曹水を加え、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出溶媒：酢酸エチル/ヘキサン＝10/90）で精製して、10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル（383 mg, 1.43 mmol, 収率



81%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  268 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.37 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3 H), 3.09 (m, 4 H), 4.33 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H), 6.34 (br s, 1 H), 6.69–6.86 (m, 3 H), 7.04–7.14 (m, 2 H), 6.72–6.78 (m, 2 H).

#### 工程 6

工程 5 で得られた 10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (443 mg, 1.66 mmol) をクロロホルム (8.3 mL) および酢酸 (8.3 mL) の混合溶媒に溶解し、ピペリジン (0.573 mL, 5.80 mmol) およびパラホルムアルデヒド (149 mg, 4.97 mmol) を加え、60°C に加熱し、1.5 日間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣に酢酸エチルと飽和重曹水を加えて、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン=70/25/5) で精製し、目的物を含む画分を濃縮した。残渣をジエチルエーテルでトリチュレーションし、8-ピペリジノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (249 mg, 0.683 mmol, 収率 41%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  365 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.34–1.46 (m, 5 H), 1.67 (m, 4 H), 2.36 (br s, 4 H), 3.08 (m, 4 H), 3.38 (s, 2 H), 4.33 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 6.32 (s, 1 H), 6.67–6.74 (m, 2 H), 6.99–7.06 (m, 2 H), 7.72–7.76 (m, 2 H).

#### 工程 7

工程 6 で得られた 8-ピペリジノメチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸エチルエステル (231 mg, 0.634 mmol) をジクロロメタン (3.2 mL) に溶解して、ヨウ化メチル (59.2  $\mu$ L, 0.951 mmol) を加え、室温で終夜攪拌した。反応溶液を減圧下濃縮して、ヨウ化 1-(8-エトキシカルボニル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (321mg, 0.634 mmol, 収率 100%) を得た。

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H), 1.75–1.95 (m, 6 H),

2.96 (br s, 4 H), 3.11 (s, 3 H), 3.50 (m, 2 H), 3.70 (m, 2 H), 4.32 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 4.90 (s, 2 H), 7.14–7.35 (m, 4 H), 7.49 (s, 1 H), 7.71 (m, 2 H).

#### 工程 8

2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン (180 mg, 1.03 mmol) をジメチルホルムアミド (0.60 mL) に溶解し、攪拌しながら水素化ナトリウム (55%, 33.6 mg, 0.770 mmol) を数回に分けて加えた後、50℃で0.5時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、ジメチルホルムアミド (1.2 mL) に溶解した工程7で得られたヨウ化1-(8-エトキシカルボニル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル)-1-メチルピペリジニウム (130 mg, 0.256 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、水、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール/クロロホルム=1/99) で精製し、目的物を含む画分を濃縮した。残渣にジエチルエーテルを加え、加熱還流条件で0.5時間攪拌し、その後室温で1時間で攪拌した。析出した結晶を濾取して化合物110 (76.7mg, 0.169 mmol, 収率 66%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  455 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 2 H), 3.40 (m, 2 H), 4.32 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2 H), 5.36 (s, 2 H), 6.35 (s, 1 H), 6.64–6.71 (m, 2 H), 6.82–6.90 (m, 3 H), 7.70–7.74 (m, 2 H).

実施例 4 2: 化合物 111 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸} の合成

実施例 4 1 で得られた化合物 110 (900 mg, 1.98 mmol) を用い、実施例 1 2 と同様にして、収率 97% で化合物 111 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  427 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.24 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.51–2.54 (s x 2,

6 H, DMSO とオーバーラップ), 2.82-2.99 (m, 6 H), 5.37 (s, 2 H), 6.84-7.03 (m, 5 H), 7.58 (m, 2 H), 8.87 (br s, 1 H), 12.25 (br s, 1 H).

実施例 4 3 : 化合物 1 1 2 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](4-メチルピペラジン-1-イル)メタノン } の合成

実施例 4 2 で得られた化合物 1 1 1 (100 mg, 0.234 mmol) をジメチルホルムアミド (2.3 mL) およびテトラヒドロフラン (4.6 mL) の混合溶媒に溶解し、これに 4-メチルピペラジン (39  $\mu$ L, 0.352 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド・1 塩酸塩 (89.7 mg, 0.468 mmol) および 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (35.8 mg, 0.234 mmol) を加えて室温で 8 時間攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィーで確認した後、反応液を濃縮した。残渣をクロロホルムで溶解し、得られた溶液を水 (2 回)、飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣にジエチルエーテルを加え、得られる懸濁液を室温で 1 時間攪拌した後、固体を濾取して化合物 1 1 2 (47.7 mg, 0.0938 mmol, 収率 40%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  509 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 2.43 (br s, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.66 (br s, 4 H), 5.35 (s, 2 H), 6.18 (s, 1 H), 6.62-6.69 (m, 2 H), 6.83 (m, 2 H), 6.85 (s, 1 H), 7.10-7.15 (m, 2 H).

実施例 4 4 : 化合物 1 1 3 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](ピロリジン-1-イル)メタノン } の合成

4-メチルピペラジンの代わりにピロリジンを用い、実施例 4 3 と同様にして、収率 90% で化合物 1 1 3 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  480 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.88 (br s, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.56 (m, 4 H), 5.35 (s, 2 H), 6.19 (s, 1 H), 6.62-6.69 (m, 2 H), 6.81-6.86 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.24-7.29 (m, 2 H).

実施例 45 : 化合物 114 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル](4-ヒドロキシピペリジノ)メタノン } の合成

4-メチルピペラジンの代わりに 4-ピペリジノールを用い、実施例 43 と同様にして、収率 62% で化合物 114 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  510 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3 H), 1.48-1.58 (m, 2 H), 1.86-1.97 (m, 2 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 2 H), 2.80 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.22-3.33 (m, 2 H), 3.91-4.00 (m, 3 H), 5.36 (s, 2 H), 6.21 (s, 1 H), 6.62-6.70 (m, 2 H), 6.81-6.85 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.08-7.14 (m, 2 H).

実施例 46 : 化合物 115 { 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸(2-ヒドロキシエチル)アミド } の合成

4-メチルピペラジンの代わりにエタノールアミンを用い、実施例 43 と同様にして、収率 82% で化合物 115 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  470 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.71 (br s, 1 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.79 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 4 H), 3.59 (m, 2 H), 3.81 (t,  $J = 9.6$  Hz, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 6.41 (s, 1 H), 6.54 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1 H), 6.63-6.71 (m, 2 H), 6.80-6.84 (m, 2 H), 6.99 (s, 1 H), 7.44-7.48 (m, 2 H).

実施例 47 : 化合物 116 { 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ

[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸[2-(ピロリジン-1-イル)エチル]アミド}の合成

4-メチルピペラジンの代わりに2-(ピロリジン-1-イル)エチルアミンを用い、実施例43と同様にして、収率92%で化合物116を得た。

APCI-MS:  $m/z$  523 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.78 (m, 4 H), 1.57 (m, 4 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.70 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2 H), 2.79 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 2.97 (m, 2 H), 3.04 (m, 2 H), 3.53 (q,  $J = 5.7$  Hz, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 6.30 (s, 1 H), 6.63-6.72 (m, 3 H), 6.83 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.45-7.52 (m, 2 H).

実施例48: 化合物117 { [8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イル] (モルホリノ)メタノン } の合成

4-メチルピペラジンの代わりにモルホリンを用い、実施例43と同様にして、収率98%で化合物117を得た。

APCI-MS:  $m/z$  496 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.99 (m, 4 H), 3.66 (m, 8 H), 5.35 (s, 2 H), 6.22 (s, 1 H), 6.62-6.71 (m, 2 H), 6.81-6.86 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.10-7.16 (m, 2 H).

実施例49: 化合物118 { 8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸ビス(2-ヒドロキシエチル)アミド } の合成

4-メチルピペラジンの代わりに2-(2-ヒドロキシエチルアミノ)エタノールを用い、実施例43と同様にして、収率38%で化合物118を得た。

APCI-MS:  $m/z$  514 ( $[M + H]^+$ )

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.21 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 2.60 (s, 3 H), 2.63

(s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.98 (m, 4 H), 3.23 (br s, 2 H), 3.63 (br s, 4 H), 3.87 (br s, 4 H), 5.35 (s, 2 H), 6.20 (s, 1 H), 6.62-6.69 (m, 2 H), 6.83 (m, 2 H), 6.89 (s, 1 H), 7.24-7.29 (m, 2 H).

実施例 50 : 化合物 119 {8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-カルボン酸アミド} の合成

4-メチルピペラジンの代わりにアンモニアを用い、実施例 43 と同様に  
して、収率 57% で化合物 119 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  426 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 2.48-2.52 (s x 2, 6H, DMSO とオーバーラップ), 2.78 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.92 (br q,  $J = 7.3$  Hz, 4 H), 5.31 (s, 2 H), 6.78-7.00 (m, 6 H), 7.52-7.65 (m, 3 H), 8.68 (s, 1 H).

実施例 51 : 化合物 120 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-(ピロリジン-1-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン} の合成

実施例 3 で得られた化合物 3 (400 mg, 0.876 mmol) を酢酸 (8.8 mL) に溶解し、パラホルムアルデヒド (0.47 g, 16 mmol) およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム (2.2 g, 10 mmol) を加えて室温で 5 時間攪拌した。反応溶液にクロロホルムと飽和重曹水を加え、水層をクロロホルムで 2 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣を  $\text{NH}$ -シリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: クロロホルム/ヘキサン=50/50) で精製して、化合物 120 (342 mg, 0.713 mmol, 収率 81%) を得た。

APCI-MS:  $m/z$  480 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.76 (m, 4 H), 2.47 (m, 4 H), 2.58 (s, 3 H), 2.62 (s, 3 H), 2.78 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 3.06 (m, 4 H), 3.29 (s, 3 H), 3.50 (s, 2 H), 5.35 (s, 2 H), 6.83-6.98 (m,

5 H), 7.02-7.08 (m, 2 H).

実施例 5 2 : 化合物 1 2 1 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸} の合成

#### 工程 1

実施例 9 で得られた化合物 1 6 (1.20 g, 2.18 mmol) を酢酸 (10 mL) に溶解し、パラホルムアルデヒド (0.73 g, 21.8 mmol) およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム (0.58 g, 8.70 mmol) を加えて室温で 15 時間攪拌した。反応溶液に酢酸エチルと 1mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を加え、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を NH-シリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒) で精製して、1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステル (1.25 g, 2.18 mmol, 収率 100%) を得た。

APCI-MS: m/z 566 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 1.6-2.0 (m, 6 H), 2.23 (m, 1 H), 2.58 (s, 3H), 2.62 (s, 3 H), 2.73 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.75-2.9 (m, 2 H), 3.0-3.15 (m, 4 H), 3.28 (s, 3 H), 3.36 (s, 2 H), 4.10 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.8-7.1 (m, 7 H).

#### 工程 2

工程 1 で得られた 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステルを用い、実施例 1 2 と同様にして、収率 42% で化合物 1 2 1 を得た。

APCI-MS: m/z 538 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.23 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3 H), 1.5–1.8 (m, 2 H), 1.8–2.0 (m, 2 H), 2.2–2.4 (m, 2 H), 2.49 (s, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.78 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2 H), 2.8–3.05 (m, 8 H), 3.22 (s, 2 H), 3.5–3.9 (m, 2 H), 5.34 (s, 2 H), 6.85 (dd,  $J = 2.0, 8.4$  Hz, 1 H), 6.93 (s, 1 H), 6.94 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1 H), 7.0–7.2 (m, 4 H).

実施例 53: 化合物 122 {2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-[4-(2H-テトラゾール-5-イル)ピペリジノメチル]-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン・1 塩酸塩} の合成

実施例 20 で得られた 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]-ピペリジン-4-カルボニトリルを用い、実施例 52 の工程 1 と同様にして、収率 92% で 1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボニトリルを得た。これを用い、実施例 20 の後段と同様にして、収率 10% で 2-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-[4-(2H-テトラゾール-5-イル)ピペリジノメチル]-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b,f]アゼピンを得た。これをクロロホルムに溶解し、4 mol/L 塩化水素・酢酸エチル溶液を加えて析出した固体を濾取することで、化合物 122 を得た。

APCI-MS:  $m/z$  562 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3 H), 2.0–2.5 (m, 4 H), 2.58 (s, 3 H), 2.63 (s, 3 H), 2.9–3.2 (m, 8 H), 3.2–3.3 (m, 4 H), 3.4–3.6 (m, 2 H), 4.17 (s, 2 H), 5.56 (s, 2 H), 7.0–7.2 (m, 4 H), 7.2–7.4 (m, 3 H), 10.79 (s, 1 H).

実施例 54: 化合物 123 {1-[8-(2-エチル-5,7-ジメチル-3H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-



5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-イルメタノール}の合成

実施例 5 2 の工程 1 で得られた 1-[8-(2-エチル-5, 7-ジメチル-3H-イミダゾ[4, 5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10, 11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-イルメチル]ピペリジン-4-カルボン酸エチルエステル (0.61 g, 1.08 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解して、-78℃に冷却し攪拌した。この反応溶液に同温度で 1 mol/L 水素化ジイソプロピルアルミニウム/トルエン溶液 (3.20 mL, 3.20 mmol) を加え、同温度で 3 時間、その後室温で 10 分間攪拌した。反応溶液に飽和ロッシェル塩水溶液と酢酸エチルを加え、30 分間攪拌した。水層を酢酸エチルで抽出後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルを用いて再結晶に付し、化合物 1 2 3 (0.26 g, 0.50 mmol, 収率 46%) を得た。

APCI-MS: m/z 524 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.0-1.15 (m, 2H), 1.23 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.25-1.3 (m, 1 H), 1.5-1.65 (m, 2 H), 1.7-1.9 (m, 2 H), 2.49 (s, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.75 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2 H), 2.95-3.05 (m, 4 H), 3.15-3.25 (m, 5 H), 3.25-3.50 (m, 4 H), 5.32 (s, 2 H), 6.81 (dd,  $J = 2.0, 8.5$  Hz, 1 H), 6.90-7.05 (m, 6 H).

実施例 5 5: 化合物 1 2 4 [2-(2-エチル-5, 7-ジメチル-3H-イミダゾ[4, 5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-8-(2H-テトラゾール-5-イル)-10, 11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン]の合成

実施例 3 4 で得られた化合物 1 0 3 を用い、実施例 5 2 の工程 1 と同様にして、収率 83% で 8-(2-エチル-5, 7-ジメチル-3H-イミダゾ[4, 5-b]ピリジン-3-イルメチル)-5-メチル-10, 11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ[b, f]アゼピン-2-カルボニトリルを得た。

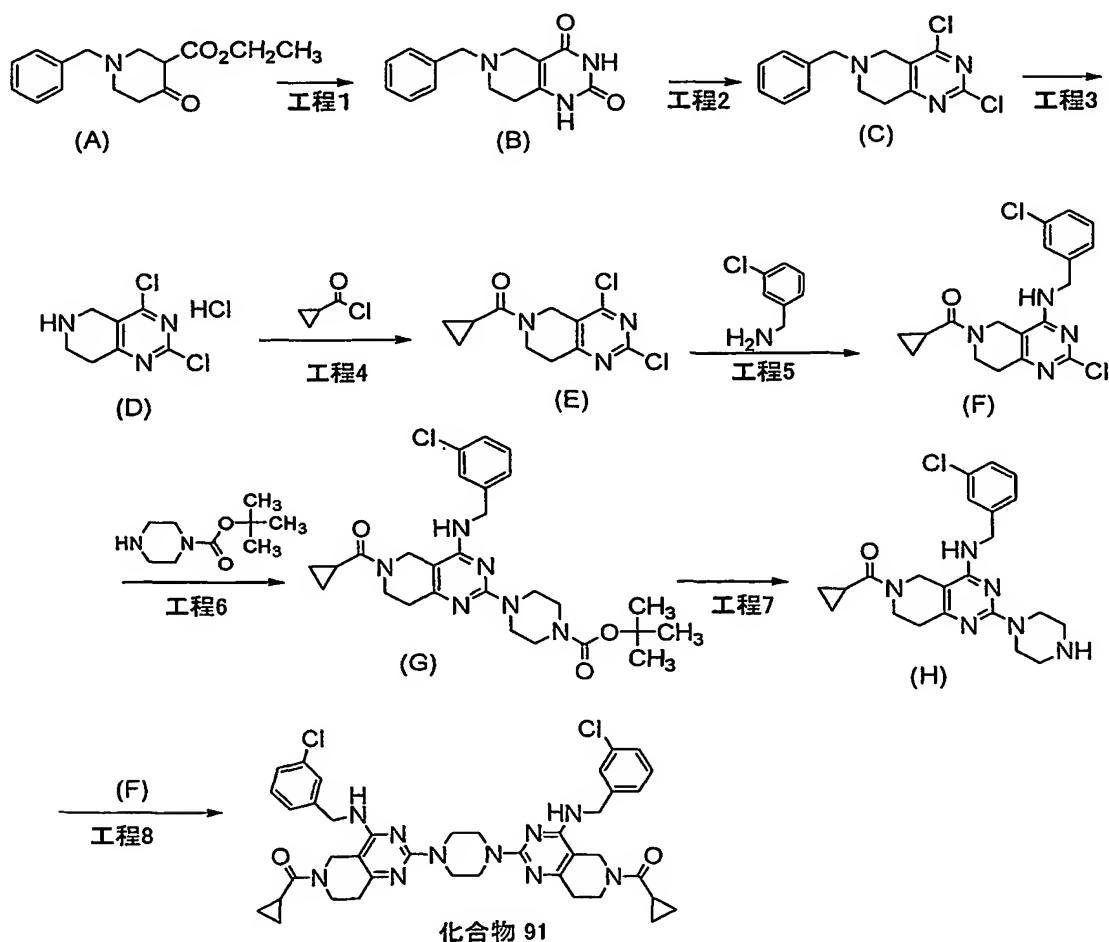
これを用い、実施例 2 0 の後段と同様にして、収率 20% で化合物 1 2 4 を得た。

APCI-MS: m/z 465 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1.24 (t,  $J = 7.7$  Hz, 3 H), 2.50 (s, 3 H), 2.51 (s, 3 H), 2.80 (q,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 3.0–3.1 (m, 2 H), 3.3–3.35 (m, 2 H), 3.40 (s, 3 H), 5.38 (s, 2 H), 6.90 (dd,  $J = 2.2, 8.4$  Hz, 1 H), 6.95 (s, 1 H), 7.02 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H), 7.10 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1 H), 7.24 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 7.75 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1 H), 7.79 (dd,  $J = 2.2, 8.4$  Hz, 1 H).

参考例 1 : 化合物 91 {1,4-ビス[4-(3-クロロベンジルアミノ)-6-シクロプロピルカルボニル-7,8-ジヒドロ-5H-ピリド[4,3-d]ピリミジン-2-イル]ピペラジン} の合成

化合物 91 は、以下の工程 1 ～ 工程 8 に従って合成した。



## 工程 1

市販の化合物 (A) (100 g, 0.335 mol) をエタノール (1,500 mL) に溶解し、尿素 (100 g, 1.67 mol) およびナトリウムメトキシド (227 g, 1.18 mol) を加え、加熱還流条件下、24 時間反応を行った。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認し、冷却後、析出した結晶を濾取した。この結晶を水に懸濁させ、その中へ塩酸 (6 mol/L) を加え、pH6.0 に調整した。さらに 1 時間室温で攪拌し、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (B) (60 g, 収率 70%) を得た。

## 工程 2

工程 1 で得られた化合物 (B) (30.0 g, 0.116 mol) にオキシ塩化リン (300 mL) を加え、加熱条件下で 5 時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認後、減圧下で過剰のオキシ塩化リンを留去した。その後、残渣に 2-プロパノール (300 mL) を加え、析出した結晶を含む懸濁液を加熱還流条件下、1 時間攪拌し、さらに室温で 1 時間攪拌した。析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物 (C) (33 g, 収率 85%) を得た。

## 工程 3

工程 2 で得られた化合物 (C) (35.0 g, 0.106 mol) を 1,2-ジクロロエタン (850 mL) に溶解し、そこへトリエチルアミン (14.9 mL, 0.107 mol) およびクロロ蟻酸 1-クロロエチル (34.1 mL, 0.316 mol) を加え、加熱還流条件下、5 時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認後、反応混合物を冷却し、水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。得られた溶液を濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、n-ヘキサン：酢酸エチル=3:1) で精製した。生成物をメタノール (850 mL) に溶解し、加熱還流条件下、1 時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーで反応の進行を確認した後、濃縮乾固させることにより、化合物 (D) (23.5 g, 収率 95%) を得た。

## 工程 4

工程 3 で得られた化合物 (D) (11.8 g, 49.1 mmol) をジクロロメタン (300 mL) に溶解し、シクロプロパンカルボニルクロリド (5.4 mL, 1.2 当量) とトリエチルアミン (20.4 mL, 3.0 当量) を加え、室温で 1 時間攪拌した。

得られた反応溶液を水、飽和重曹水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣にジイソプロピルエーテルを加え、懸濁液を1時間以上攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合物(E) (12.5g, 収率 94%) を得た。

#### 工程 5

工程4で得られた化合物(E) (12.5g, 45.9 mmol) をテトラヒドロフラン (400 mL) に溶解し、トリエチルアミン (19.2 mL, 3 当量) および3-クロロベンジルアミン (11.2 mL, 2 当量) を加えた後、40℃で20時間攪拌した。析出した塩を濾過により除去後、溶媒を留去した。残渣をクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1 → 40 : 1) で精製し、目的物を含む画分の濃縮残渣にヘキサン/酢酸エチル混合溶媒 (3:1) を加え、結晶を析出させた。結晶を含む懸濁液を1時間攪拌後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物(F) (11.9g, 収率 69%) を得た。

#### 工程 6

工程5で得られた化合物(F) (5.0g, 13.3 mmol) をジオキサン (100 mL) に溶解し、tert-ブチル 1-ピペラジンカルボキシレート (4.9g, 2 当量) と炭酸ナトリウム (14.0g, 10 当量) を加え、90℃で3日間攪拌した。得られた反応溶液を濾過し、炭酸ナトリウムを除去後、濾液に水およびクロロホルムを加えて抽出を行い、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣にヘキサン/酢酸エチル混合溶媒 (3:1) を加え、懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物(G) (6.4g, 収率 92%) を得た。

#### 工程 7

工程6で得られた化合物(G) (6.3g, 12.0 mmol) に20%トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液 (50 mL) を加え、室温で一時間攪拌した。反応溶液から溶媒を留去した後、残渣にジイソプロピルエーテルを加え、生成した懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させ、化合物(H) を得た (4.9 g, 収率 97%)。

#### 工程 8

工程7で得られた化合物(H) (3.8 g, 8.90 mmol) と、工程5で得られた

化合物(F) (4.5g, 1.05 当量) をジオキサン (100 mL) に溶解し、炭酸ナトリウム (10.6g, 10 当量) を加え、90℃で1週間攪拌した。得られた反応溶液を濾過し、炭酸ナトリウムを除去後、濾液に水を加えクロロホルムで抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル: トリエチルアミン=10:1)で精製した。目的物を含む画分の濃縮残渣にヘキサン/酢酸エチル混合溶媒(3:1)を加え、生成した懸濁液を1時間攪拌した。その後、析出した結晶を濾取し、減圧下で乾燥させることにより、化合物91を得た(1.0g, 収率 23%)。

APCI-MS:  $m/z$  767 ( $[M + H]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 0.7-0.9 (m, 4 H), 1.0-1.1 (m, 4 H), 1.7-1.9 (m, 2 H), 2.6-2.8 (m, 4 H), 3.75 (s, 8 H), 3.8-4.0 (m, 4 H), 4.3-4.4 (m, 4 H), 4.6-4.7 (m, 4 H), 4.8-4.9 (m, 2 H), 7.1-7.3 (m, 8 H).

参考例 1 a N-メチル-N-(2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメチル)アミンの合成

2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イルメタノール (2.00 g, 5.84 mmol)、N-メチル-2-ニトロベンゼンスルホンアミド (1.64 g, 7.59 mmol) およびトリフェニルホスフィン (1.53 g, 5.84 mmol) をテトラヒドロフラン (30 mL) およびトルエン (20 mL) の混合溶媒に溶解し、アゾジカルボン酸ジエチルトルエン溶液 (40%, 2.65 mL, 5.84 mmol) を加えて室温で終夜攪拌した。シリカゲルカラムを通過 (溶出溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン=40/60) させて原点成分を除去した後、減圧下濃縮して得られる残渣にアセトン (5 mL) とアセトニトリル (25 mL) を加えた。

得られた懸濁液にメルカプト酢酸 (0.73 mL, 11 mmol) と1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]ウンデック-7-エン (3.1 mL, 21 mmol) を加えて60℃で7時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解した。得られた溶液を飽和重曹水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出溶媒: トリエチルアミン/酢酸エチル=1/99)で精製し、N-メチル-N-(2-トリチル-2H-テトラゾール-5-イル)メチルアミン (396 mg, 1.11 mmol, 収率 19.0%)

を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2.45 (s, 3H), 4.07 (s, 2H), 7.07–7.36 (m, 15H).

## 参考例 2 : 宿主・ベクター系の構築

### (1) Gal4-ER 発現プラスミド pGERbsrR2 の造成

pSV2bsr(科研製薬社製)を PvuII と EcoRI で切断後、Klenow 処理して 2.6kb の PvuII (平滑末端) – EcoRI (平滑末端) 断片を取得した。

Gal4-ER キメラ遺伝子 [セル (Cell)、54 巻、199 頁 (1988 年)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、90 巻、1657 頁 (1993 年)] を含有する ER $\alpha$  AF2 in pM (東京大学の加藤茂明先生より分与) を AatII と NdeI で切断後、Klenow 処理して、AatII (平滑末端) – NdeI (平滑末端) 断片を取得した。

上記の pSV2bsr 由来の PvuII (平滑末端) – EcoRI (平滑末端) 断片、および ER $\alpha$  AF2 in pM 由来の AatII (平滑末端) – NdeI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミド pGERbsrR2 を造成した。pGERbsrR2 は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の転写因子 Gal4p の DNA 結合領域とエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質 (Gal4-ER) を発現することができる。

### (2) ホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドの造成

pcDNA3(インビトロジェン社)を XhoI で切断後、Klenow 処理して、XhoI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI 切断部位を消失させた pcDNA3 を造成した。XhoI 切断部位を消失させた pcDNA3 を KpnI で切断後、Klenow 処理して、KpnI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI および KpnI 切断部位を消失させた pcDNA3 を造成した。該プラスミドを BglIII で切断後、Klenow 処理し、BglIII (平滑末端) 断片を取得した。

pAMoERC3Sc(特開平 05-336963)を XhoI と NsiI で切断後、Klenow 処理し、oriP 配列を含む 2.2kb の XhoI (平滑末端) – NsiI (平滑末端) 断片を取得した。

上記の XhoI 切断部位と KpnI 切断部位を消失させた pcDNA3 由来の BglII (平滑末端) 断片、および pAMoERC3Sc 由来の XhoI (平滑末端) -NsiI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミド pcDNA3-oriP を造成した。pcDNA3-oriP を XhoI と HindIII で切断し、XhoI-HindIII 断片を取得した。

pSE0luc2 (W098/14474) を XhoI と NcoI で切断後、Klenow 処理して、アンピシリン耐性遺伝子を含む XhoI (平滑末端) -NcoI (平滑末端) 断片を取得した。該断片を結合することにより、プラスミド pASd1-luc1 を造成した。pASd1-luc1 を XhoI と HindIII で切断後、0.11kb の XhoI-HindIII 断片を取得した。

上記 pcDNA3-oriP 由来の XhoI-HindIII 断片、および pASd1-luc1 由来の XhoI-HindIII 断片を結合し、プラスミド pcDNA3-oriP-Sd1 を造成した。pcDNA3-oriP-Sd1 を XhoI と KpnI で切断し、XhoI-KpnI 断片を取得した。

配列番号 1、2、3、および 4 で表される塩基配列を有する 4 種の DNA を DNA 合成機で合成した。該合成 DNA は混合してアニールすることによりポリ A 付加シグナルをもつ 2 本鎖 DNA を形成する。該合成 DNA をそれぞれ T4 polynucleotide kinase を用いてリン酸化後、混合してアニールさせることにより、二本鎖 DNA とした。

該二本鎖 DNA と pcDNA3-oriP-Sd1 由来の XhoI-KpnI 断片を結合することにより、プラスミド pcDNA3-oriP-Sd1-pA を造成した。pcDNA3-oriP-Sd1-pA を XhoI で切断後、Klenow 処理して、XhoI (平滑末端) 断片を取得した。

pFR-luc(ストラタジーン社製)を HindIII と BamHI で切断後、Klenow 処理し、0.14kb の HindIII (平滑末端) -BamHI (平滑末端) 断片を取得した。

上記の pcDNA3-oriP-Sd1-pA 由来の XhoI (平滑末端) 断片、および pFR-luc 由来の HindIII-BamHI 断片を結合し、プラスミド pAGalSd1 を作製した。pAGalSd1 は、Gal4p 応答配列 (UASG) を 5 回繰り返した配列を有するプロモーターを含有している。pAGalSd1 を EcoRI で切断後、Klenow 処理し、EcoRI (平滑末端) 断片を取得した。

pSE0luc2 (W098/14474) を HindIII と SacI で切断後、Klenow 処理することにより、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む 1.7kb の HindIII (平滑末

端) -SacI (平滑末端) 断片を取得した。

上記の pSE01uc2 由来の HindIII (平滑末端) -SacI (平滑末端) 断片、および pAGalSd1 由来の EcoRI (平滑末端) 断片を結合することにより、プラスミド pAGalSd1-luc を造成した。

pAGalSd1-luc 内に存在する二つの HindIII サイトのうち、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子からより離れた HindIII サイトのみを Klenow 処理により消失させることにより、pAGalSd4-luc を造成した。

pAGalSd4-luc を Asp718 で切断後、StuI で部分消化し pAGalSd4-luc 由来の 9.5kb の Asp718-StuI 断片を取得した。該 DNA 断片を Klenow 処理し、自己結合させることによりプラスミド pAGal9-luc を造成した。

### (3) 誘導発現ベクター pAGal9-d および pAGal9-nd の造成

エプスタイン・バー・ウイルスの oriP を有する発現プラスミド pAGal9-luc を HindIII と SacI で切断し、oriP を含む 6.9kb の HindIII-SacI 断片を取得した。

pAMo-d (特開 2001-211885) を HindIII と SacI で切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc<sup>R</sup>) を含む HindIII-SacI 断片を取得した。

上記の pAGal9-luc 由来の HindIII-SacI 断片、および pAMo-d 由来の HindIII-SacI 断片を結合することにより、pAGal9-luc 中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分を pAMo-d の Stuffer 配列と置き換えたプラスミド pAGal9-d を造成した。pAGal9-luc を HindIII と SacI で切断し 6.9kb の HindIII-SacI 断片を取得した。

pAMo-nd (特開 2001-211885) を HindIII と SacI で切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子を含む HindIII-SacI 断片を取得した。

上記の pAGal9-luc 由来の HindIII-SacI 断片、および pAMo-nd 由来の HindIII-SacI 断片を結合することにより、pAGal9-luc 中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分を pAMo-nd の Stuffer 配列と置き換えたプラスミド pAGal9-nd を造成した。

(4) Gal4-ER 発現プラスミド pGERbsrR2 を Namalwa KJM-1 細胞の染色体 DNA に組み込んだ細胞株 KJMGER8 の造成

Gal4-ER キメラ転写因子発現プラスミド pGERbsrR2 を、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるよ



うに TE 緩衝液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1 mmol/L エチレンジアミン 4 酢酸] に溶解した後、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology)、3 巻、133 頁 (1990 年)] により、該プラスミドを Namalwa KJM-1 細胞 [サイトテクノロジー (Cytotechnology)、1 巻、151 頁 (1988 年)] に、 $6 \times 10^6$  細胞あたり  $4 \mu\text{g}$  導入し、形質転換細胞を得た。Namalwa KJM-1 細胞は、EBNA-1 遺伝子を発現する無血清馴化した B 細胞株である。

該形質転換細胞を、8ml の RPMI1640・ITPSG 培地 [RPMI1640 培地 (日水製薬社製) に、1/40 量の 7.5%  $\text{NaHCO}_3$ 、3% 200mmol/L L-グルタミン溶液 (インビトロジェン社製)、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (インビトロジェン社製、5,000units/ml ペニシリン、5,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン)、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; HEPES)、3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インシュリン、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  トランスフェリン、5 mmol/L ピルビン酸ナトリウム、125 nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1 mg/ml ガラクトースを添加した培地] に懸濁し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター中で  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養した。

培養後、プラストサイジン S (Blasticidin S) (KK-400: 科研製薬社製) を  $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し、96 穴プレートに分注 (500~2000 細胞/穴) して培養を行い、pGERbsrR2 が染色体 DNA に組み込まれた安定形質転換株 (シングルクローン) を多数取得した。各形質転換株は、 $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  のプラストサイジン S を含む RPMI1640・ITPSG 培地で継代した。

下記に示す方法により上記安定形質転換株から、誘導倍率が高く、かつ非誘導時のバックグラウンドが低い優れた安定形質転換株 KJMG8 細胞を選別した。

各形質転換株にホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミド pAGalSd1-luc をエレクトロポレーション法により導入し、2 日間培養した。

培養後、 $17\beta$ -エストラジオール (E8875: シグマ社製) (終濃度 10nmol/L) を添加し、さらに 24 時間培養後、ホタル・ルシフェラーゼ活性の測定を行った。活性の測定には、ルミノメーター LB953 (ベルトールド社製) を用い、細胞溶解用緩衝液 [1% トリトン X-100、100 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH7.8)、1 mmol/L

ジチオスレイトール] 100  $\mu$ l を、上記培養液に自動注入後、基質溶液 [25 mmol/L グリシルグリシン (pH7.8)、15 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、5 mmol/L ATP、0.33 mmol/L ルシフェリン] 300  $\mu$ l を自動注入し、10 秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。比較のために、 $17\beta$ -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

$17\beta$ -エストラジオール添加条件下でのルシフェラーゼ活性と  $17\beta$ -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性を比較することにより、遺伝子発現の誘導倍率を算出し、該誘導倍率が高く、かつ  $17\beta$ -エストラジオール無添加条件下のルシフェラーゼ活性が低いクローンとして、KJMG8 細胞を選択した。

### 参考例 3：ホタル・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミド pACREpluc の造成

cAMP 応答配列 (CRE) の制御下にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を発現することのできるレポータープラスミドである pACREpluc を以下の方法で造成した。pACREpluc は、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびエプスタイン・バー・ウィルスの oriP を有している。

pAMo [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、268 巻、22782 頁 (1993 年)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平 5-336963)] を ClaI で部分消化し、一カ所切断された DNA 断片を取得した。該 DNA 断片を MluI で部分消化し、9.5kb の ClaI-MluI 断片を取得した。pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、269 巻、14730 頁 (1994 年)] を ClaI および MluI で切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む 1.5kb の ClaI-MluI 断片を取得した。pAMo 由来の ClaI-MluI 断片、および pAGE248 由来の ClaI-MluI 断片を結合し、プラスミド pAMoh を造成した。

pAMoh を XhoI と HindIII で切断後、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む XhoI-HindIII 断片を取得した。pAGal9-luc を SalI と HindIII で切断し、oriP、Gal4UAS を含む SalI-HindIII 断片を取得した。pAGal9-luc 由来の SalI-HindIII 断片、および上記 pAMoh 由来の XhoI-HindIII 断片を結合することにより、プラスミド pAGal9h を造成した。

pBluescriptII KS+ (東洋紡績社製) を SalI および XhoI で切断した後、ホスファターゼ (Alkaline Phosphatase E. coli C75、宝酒造社製) を用いて脱リン酸化処理し、アンピシリン耐性遺伝子を含む SalI-XhoI 断片を取得した。配列番号 5 および 6 で表される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより、CRE 配列を 2 つ含む二本鎖 DNA を調製した。該二本鎖 DNA と pBluescriptII KS+由来の上記 SalI-XhoI 断片を結合し、CRE 配列を 2 つ含むプラスミド pBS-CREI を造成した。pBS-CREI は、該二本鎖 DNA が、SalI 切断部位および XhoI 切断部位が再生する方向に組み込まれたプラスミドであり、上記切断部位をそれぞれ 1 つ有している。

pBS-CREI を ScaI および XhoI で切断しファージ f1 の ori を含む ScaI-XhoI 断片を取得した。pBS-CREI を ScaI および SalI で切断し ColE1 ori を含む ScaI-SalI 断片を取得した。pBS-CREI 由来の ScaI-XhoI 断片および ScaI-SalI 断片を結合し、CRE 配列を 4 つ含む pBS-CREII を造成した。

pBS-CREII を ScaI および XhoI で切断しファージ f1 の ori を含む ScaI-XhoI 断片を取得した。pBS-CREII を ScaI および SalI で切断し ColE1 ori を含む ScaI-SalI 断片を取得した。pBS-CREII 由来の ScaI-XhoI 断片および ScaI-SalI 断片を結合し、CRE 配列を 8 つ含む pBS-CREIV を造成した。

pBS-CREIV を ScaI および XhoI で切断しファージ f1 の ori を含む ScaI-XhoI 断片を取得した。pBS-CREIV を ScaI および SalI で切断し ColE1 ori を含む ScaI-SalI 断片を取得した。pBS-CREIV 由来の ScaI-XhoI 断片および ScaI-SalI 断片を結合し、CRE 配列を 16 含む pBS-CREVIII を造成した。

pBS-CREVIII を XhoI で切断後、Klenow 処理し、さらに HindIII で切断することにより、16 個の CRE を含む HindIII-XhoI (平滑末端) 断片を取得した。pAGalSd1 を MluI と HindIII で切断し、1.4kb の MluI-HindIII 断片を取得した。pAGal9h を XbaI で切断後、Klenow 処理し、更に MluI で切断することにより XbaI (平滑末端) -MluI 断片を取得した。pBS-CREVIII 由来の HindIII-XhoI (平滑末端) 断片、pAGalSd1 由来の MluI-HindIII 断片、および pAGal9h 由来の XbaI (平滑末端) -MluI 断片を結合し、プラスミド pACREh を造成した。

pAGal9-luc を XhoI と NotI で切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を

含む XhoI - NotI 断片を取得した。pACREh を XhoI と NotI で切断し、CRE 配列を含む XhoI - NotI 断片を取得した。pAGal9-luc 由来の XhoI - NotI 断片、および pACREh 由来の XhoI - NotI 断片を結合することによりプラスミド pACREluc を造成した。

pACREluc を HindIII で切断後、Klenow 処理し、さらに XhoI で切断することにより CRE を含む HindIII (平滑末端) - XhoI 断片、およびホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む HindIII (平滑末端) - XhoI 断片をそれぞれ取得した。pACREluc 由来の上記 2 種の HindIII (平滑末端) - XhoI 断片を結合することにより、pACREluc 中の CRE 配列上流の HindIII サイトが消失したプラスミド pACRElucH を造成した。

pGL3-Enhancer vector [プロメガ(Promega)社製] を HindIII と HpaI で切断し、luc+遺伝子 (改変型のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子) を含む HindIII - HpaI 断片を取得した。pACRElucH を NotI で切断後、Klenow 処理し、更に HindIII で切断することにより、CRE を含む HindIII - NotI (平滑末端) 断片を取得した。pGL3-Enhancer vector 由来の HindIII - HpaI 断片、および pACRElucH 由来の HindIII - NotI (平滑末端) 断片を結合することによりプラスミド pACREpluc を造成した。

#### 参考例 4 : GPR4 誘導発現プラスミドの造成

ヒト肺由来の mRNA (クロンテック社製) を 1  $\mu$ g 用い、SUPERSCRIPRT First-Strand Synthesis System for RT-PCR (ギブコ社製) により一本鎖 cDNA を合成した。該一本鎖 cDNA を水で 250 倍希釈した溶液 5  $\mu$ l を鋳型として、配列番号 7 および 8 に示した配列を有する合成 DNA を GPR4 遺伝子特異的プライマーとして用い、PCR により GPR4 cDNA を取得した。GPR4 遺伝子特異的プライマーの配列は、GPR4 遺伝子の配列情報 (GenBank 受入番号: U21051) に基いて設計した。酵素としては、PfuTurbo DNA Polymerase

(Stratagene 社製) を用いた。PCR を行う際の緩衝液としては、使用する酵素に付加された 10 倍濃度の緩衝液を使用した。PCR は、サーマルサイクラー DNA engine (MJ Research 社製) を用い、95°C で 5 分間の処理後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間からなる反応を 30 サイクル行うこと

により実施した。

増幅された GPR4 cDNA 断片をプライマー上に設計された配列を切断する HindIII および Not I で切断した。GPR4 cDNA を含む断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。

該切断断片を、プラスミド pAGal9-nd の HindIII - Not I 間へ組み込むことにより、GPR4 誘導発現プラスミド pAGal9-GPR4 を構築した。

pAGal9-nd 中の配列に特異的なプライマー（配列番号 9 および 10 に示した配列を有する合成 DNA）を用いて、該 cDNA の 5'側および 3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成 DNA を調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該 cDNA の全塩基配列を決定し GPR4 をコードしていることを確認した。塩基配列の決定には、パーキン・エルマー社の DNA シークエンサー 377 と反応キット（ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: アプライド・バイオシステムズ社）を使用した。

プラスミドに組み込んだ DNA 断片の配列を決定し、GPR4 をコードしていることを確認した。

#### 参考例 5 : GPR4 のアッセイ細胞の構築

GPR4 誘導発現プラスミド pAGal9-GPR4 (2  $\mu$ g) およびレポータープラスミド pACREpluc (2  $\mu$ g) を、上記エレクトロポレーション法により、 $6 \times 10^6$  細胞の KJMGER8 に共導入した。該形質転換株を 8ml の RPMI1640・ITPSG 培地に懸濁し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 24 時間培養した。培養後、プラストサイジン S (2.0  $\mu$ g/ml)、ハイグロマイシン B (300  $\mu$ g/ml) およびジェネティシン (500  $\mu$ g/ml) を添加し、さらに 14 日間培養して安定形質転換株 (GPR4 アッセイ細胞と呼ぶ) を取得した。該形質転換株を、プラストサイジン S (2.0  $\mu$ g/ml)、ハイグロマイシン B (300  $\mu$ g/ml) およびジェネティシン (500  $\mu$ g/ml) を含む RPMI1640・ITPSG 培地で継代した。

同様に、コントロールプラスミド pAGal9-nd (2  $\mu$ g) およびレポータープラスミド pACREpluc (2  $\mu$ g) を KJMGER8 に共導入し、安定形質転換株 (コントロール細胞と呼ぶ) を取得した。

参考例 6 : マウス由来のヒト GPR4 ホモログをコードする DNA のクローニング

ヒト GPR4 遺伝子の塩基配列情報 [Accession (AC) No. U21051] を基に、NCBI のデータベースを対象として検索を行った。その結果、相同性の高い配列として、マウスゲノム配列 (AC073784) および複数の Expression sequence tag (EST) 配列 (BF178464、AA968193、AA798732、AI840893、AI851037) が選択された。該マウスゲノム配列と EST から構築された遺伝子の塩基配列を配列番号 14 に、該遺伝子によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 13 に示した。該アミノ酸配列を、解析プログラム [GENETYX WIN ver. 5.0 (ソフトウェア社製)] を用いてヒト GPR4 のアミノ酸配列と比較したところ、92.7% の一致が認められた。

よって、配列番号 13 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、マウスのヒト GPR4 ホモログ (マウス GPR4) であることが推定された。

従って、マウス GPR4 をコードする DNA は、市販、または公知の方法で調製することができるマウス cDNA ライブラリーを鋳型にし、配列番号 14 で表される塩基配列に基づき設計、合成できるオリゴヌクレオチドをプライマーセットに用いた PCR により取得することができる。

参考例 7 : ラット由来のヒト GPR4 ホモログをコードする DNA のクローニング

ヒト GPR4 遺伝子の塩基配列情報 (AC No. U21051) を基に、NCBI のデータベースを対象として検索を行った。その結果、相同性の高い配列として 2 つのラットゲノム配列 (AC119447.2 および AC096180.2) および複数のラット EST 配列 (BF544182、AI170948、AI008858、AI235374、AI502871、BQ194515) が選択された。これらの配列と、配列番号 14 で示したマウスの塩基配列情報を基に配列番号 15 および配列番号 16 に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを作製した。

該オリゴヌクレオチド各々  $1.0 \mu\text{mol/L}$  をプライマーセットとして用い、ラット肺由来 mRNA から作製した cDNA  $2 \mu\text{L}$  を鋳型に用い、後記の各成分の

濃度が  $200 \mu\text{mol/L}$  となるよう dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、Taq Gold (パーキンエルマー社製) 2.5 単位および  $1 \times$  Taq Gold (Mg plus) 緩衝液 (パーキンエルマー社) を含む反応溶液  $40 \mu\text{L}$  を調製し、下記条件下で PCR を行った。

すなわち、サーマルサイクラー PTC-200 (MJ リサーチ社製) を用い、 $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱後、 $94^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、 $55^{\circ}\text{C}$  で 1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分間の工程を 1 サイクルとして 30 サイクル行い、さらに  $72^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱した。

得られた PCR 反応液より  $5 \mu\text{L}$  を分取し、アガロースゲル電気泳動により GPR4 をコードする DNA と予想される約 1.1kb の DNA 断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、該製品に添付されたマニュアルに従い、DNA 断片を溶出し回収した。

上記で回収した DNA 断片 50ng と pT7Blue T-Vector (Novagen 社製) 50ng とを DNA Ligation kit ver. 2 (宝酒造社製) を用いて該製品に添付されたマニュアルに従って連結し、組換えプラスミド DNA を得た。得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換して得られる形質転換株から、常法によりプラスミド pT7RG を得た。プラスミド pT7RG の全塩基配列を決定した結果、pT7RG には配列番号 18 で表される塩基配列を有する約 1.1kb の cDNA が含まれていた。配列番号 18 で表される塩基配列からなる DNA にコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 17 に示した。該アミノ酸配列を、解析プログラム [GENETYX WIN ver. 5.0 (ソフトウェア社製)] を用いてヒト、およびマウス GPR4 のアミノ酸配列と比較したところ、それぞれ 93.0%、99.2% の一致が認められた。

よって、配列番号 17 で表されるアミノ酸を有するポリペプチドは、ラットのヒト GPR4 ホモログ (ラット GPR4) であることが明らかとなった。

## 製剤例 1 : 錠剤

常法により、次の組成からなる錠剤を調製する。

|    |                |          |
|----|----------------|----------|
| 処方 | 化合物 1          | 20 mg    |
|    | 乳糖             | 143.4 mg |
|    | デンプン           | 30 mg    |
|    | ヒドロキシプロピルセルロース | 6 mg     |
|    | ステアリン酸マグネシウム   | 0.6 mg   |
|    |                | 200 mg   |

## 製剤例 2 : 注射剤

常法により、次の組成からなる注射剤を調製する。

|    |          |         |
|----|----------|---------|
| 処方 | 化合物 5    | 2 mg    |
|    | 精製ダイズ油   | 200 mg  |
|    | 精製卵黄レシチン | 24 mg   |
|    | 注射用グリセリン | 50 mg   |
|    | 注射用蒸留水   | 1.72 ml |
|    |          | 2.00 ml |

産業上の利用可能性

本発明により、GPR4 のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤、掻痒の予防および／または治療作用を有する含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩、GPR4 のシグナル伝達に関する機能の抑制作用を有する含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩、含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤、含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩



を有効成分として含有する GPR4 のシグナル伝達に関する機能の抑制剤、ならびに SPC 誘発搔破行動の回数の減少を指標にした搔痒治療剤のスクリーニング法が提供される。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 3 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 4 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 5 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 6 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 7 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 8 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 9 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 10 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 15 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 16 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 19 - 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 20 - 人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. 配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

2. 以下の 1) ～ 4)

1) 配列番号 1 2 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ～ 6 0 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

2) 配列番号 1 4 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ～ 6 0 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

3) 配列番号 1 8 記載の塩基配列から選ばれる連続した 5 ～ 6 0 塩基からなるオリゴヌクレオチドの相補的配列を有するオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

4) 配列番号 1 2、1 4 および 1 8 から選ばれるいずれか一つに記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する 5 ～ 6 0 塩基からなるオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体、

のいずれか一つを有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

3. 以下の 1) ～ 4)

1) 配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

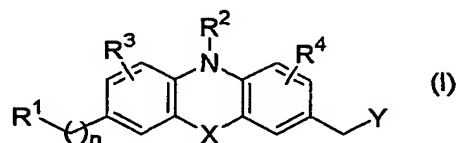
2) 配列番号 1 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

3) 配列番号 1 7 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体、

4) 配列番号 1 1、1 3 および 1 7 から選ばれるいずれか一つに記載のアミノ酸配列において一つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸

配列を有し、かつ配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を有する蛋白質を認識する抗体、  
 のいずれか一つを有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

#### 4. 式 (I)



[式中、 $R^1$ は置換もしくは非置換の複素環基、 $-NR^5R^6$  (式中、 $R^5$ および $R^6$ は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $R^5$ および $R^6$ が隣接する窒素原子と一緒に置換もしくは非置換の複素環基を形成する)、 $-OR^7$  (式中、 $R^7$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換の低級アルカノイル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す)、 $-SR^{7a}$  (式中、 $R^{7a}$ は前記 $R^7$ と同義である)、 $-CONR^{5a}R^{6a}$  (式中、 $R^{5a}$ および $R^{6a}$ はそれぞれ前記 $R^5$ および前記 $R^6$ と同義である)、 $-CO_2R^{7b}$  (式中、 $R^{7b}$ は前記 $R^7$ と同義である)、 $-N^+R^{5b}R^{6b}R^8$  (式中、 $R^{5b}$ および $R^{6b}$ はそれぞれ前記 $R^5$ および前記 $R^6$ と同義であり、 $R^8$ は低級アルキル、低級アルケニル、またはアラルキルを表す)、ホルミル、カルボキシ、またはシアノを表し、

$R^2$ は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非

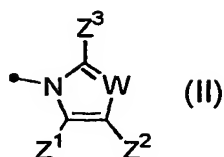
置換の複素環アルキルを表し、

$R^3$  および  $R^4$  は同一または異なって水素、低級アルキル、またはハロゲンを表し、

$n$  は 0 または 1 を表し、

$X$  は  $-(CH_2)_2-$  または  $-CH=CH-$  を表し、

$Y$  は式 (II)



(式中、 $W$  は CH または窒素原子を表し、

$Z^1$  および  $Z^2$  は同一または異なって水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表すか、 $Z^1$  および  $Z^2$  がそれぞれ隣接する 2 つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の芳香環または置換もしくは非置換の複素環を形成し、

$Z^3$  は水素、置換もしくは非置換の低級アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換の低級アルケニル、置換もしくは非置換の低級アルキニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換の複素環基、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換の複素環アルキルを表す) を表す] で表される含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

5.  $R^1$  が  $-NR^5R^6$  であり、 $R^5$  および  $R^6$  が隣接する窒素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環基を形成する請求の範囲第 (4) 項に記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

6.  $R^2$  が水素である請求の範囲第(4)項または第(5)項に記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

7.  $R^3$  および  $R^4$  が水素である請求の範囲第(4)項～第(6)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

8.  $Z^1$  および  $Z^2$  がそれぞれ隣接する2つの炭素原子と一緒になって置換もしくは非置換の複素環を形成する請求の範囲第(4)項～第(7)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩。

9. 請求の範囲第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬。

10. 請求の範囲第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する掻痒の予防および／または治療剤。

11. 請求の範囲第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能の抑制剤。

12. 以下の1)～4)

1) ヒトを除く哺乳類動物にスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を皮下および皮内投与することによりヒトを除く哺乳類動物における搔破行動

を誘発する工程、

2) 試験化合物存在下または非存在下での SPC により誘発されたヒトを除く哺乳類動物における搔破行動の回数を測定する工程、

3) 試験化合物存在下と試験化合物非存在下での SPC により誘発されたヒトを除く哺乳類動物における搔破行動の回数を比較する工程、および

4) 試験化合物から SPC により誘発された搔破行動の回数を減少させる物質を選択する工程、

を含む搔痒治療剤のスクリーニング法。

13. 請求の範囲第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の有効量を投与することを特徴とする、搔痒の予防および／または治療方法。

14. 搔痒の予防および／または治療剤の製造のための請求の範囲第(4)項～第(8)項のいずれかに記載の含窒素三環式化合物もしくはその四級アンモニウム塩またはそれらの薬理学的に許容される塩の使用。

15. 搔痒が皮膚疾患、肝・胆道疾患、腎疾患、内分泌・代謝疾患、血液疾患、悪性腫瘍、神経疾患およびAIDSから選択される疾患に伴う搔痒である請求の範囲第(1)～(3)項および第(10)項のいずれかに記載の搔痒の予防および／または治療剤。

16. 搔痒が皮膚疾患に伴う搔痒であり、該皮膚疾患がアトピー性皮膚炎、湿疹・皮膚炎、蕁麻疹、痒疹、乾皮症、虫刺症、疥癬、真菌症、皮膚搔痒症、肥厚性瘢痕、乾癬、水疱症および薬疹から選択される皮膚疾患である請求の範囲第(15)項記載の搔痒の予防および／または治療剤。

17. 配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の治療有効量を投与することを特徴とする、搔痒の

予防および／または治療方法。

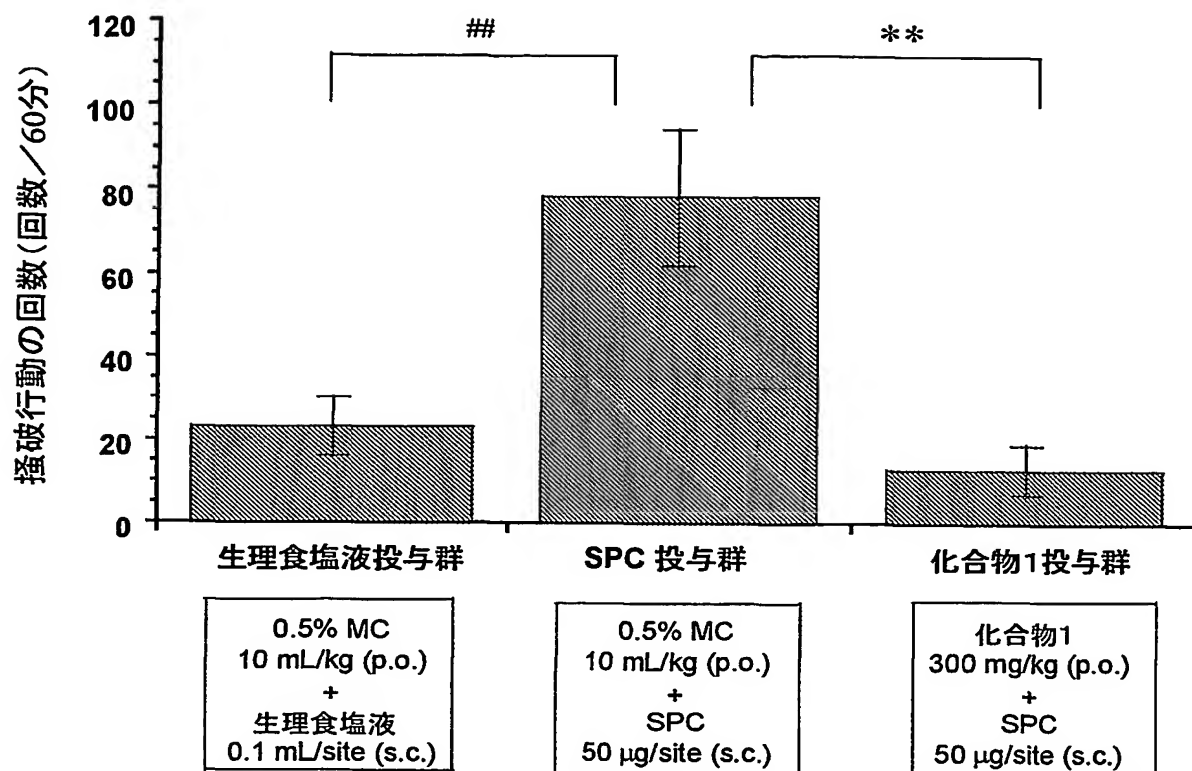
18. 請求の範囲第(2)項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の治療有効量を投与することを特徴とする、掻痒の予防および／または治療方法。

19. 請求の範囲第(3)項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の治療有効量を投与することを特徴とする、掻痒の予防および／または治療方法。

20. 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質の使用。

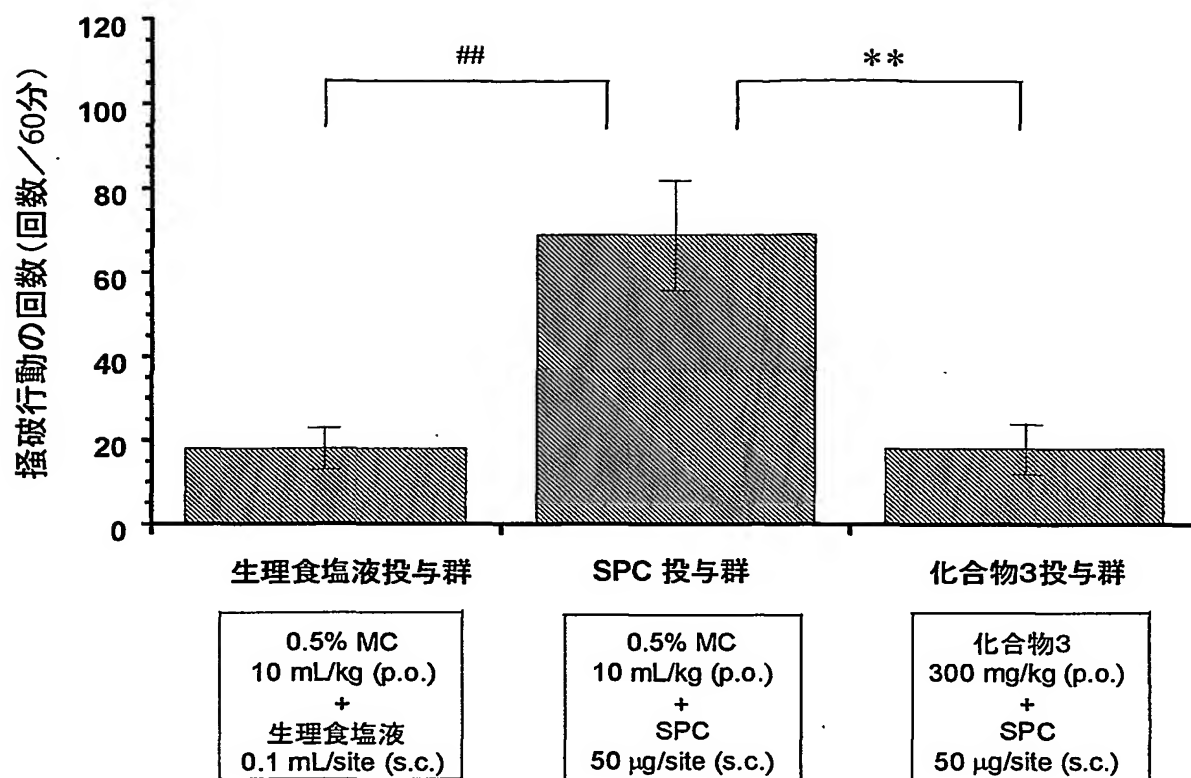
21. 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための、請求の範囲第(2)項に記載の1)～4)のいずれか一つのオリゴヌクレオチドまたは該オリゴヌクレオチド誘導体の使用。

22. 掻痒の予防および／または治療剤の製造のための、請求の範囲第(3)項に記載の1)～4)のいずれか一つの抗体の使用。



第1図





第2図

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> An agent for preventing and/or treating itching

<130> 11503W01

<140>

<141>

<150> JP 2002/241522

<151> 2002-08-22

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tcgacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaa

54

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

tgcattgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa ttgtgatgc tattgcttta ttg 54

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

tgcattctag ttgtggttg tccaaactcg agcccgagg 39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

gtacccccgg gctcgagttt ggacaaacca caactagaa 39

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

tcgacggtat cgattcgact gacgtcatatc ttgacgtcac

40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

tcgagtgacg tcaagtatga cgtcagtcga atcgataccg

40

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

gccccagaag cttaagtgcc caccatggg

29

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

gttcattgtg gcggccgcag catcttcagc tgc

33

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cggagactct agagggtata taatg

25

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

ctaatacgac tcactatagg g

21

<210> 11

<211> 362

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 11

Met Gly Asn His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp  
1 5 10 15

His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu  
20 25 30

Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln  
35 40 45

Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu  
50 55 60

Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His  
65 70 75 80

Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile  
85 90 95

Phe Tyr Thr Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser  
100 105 110

Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu  
115 120 125

Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr  
130 135 140

Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg  
145 150 155 160

Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly  
165 170 175

Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe  
180 185 190

Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val  
195 200 205

Arg Gly Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg  
210 215 220

Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr  
225 230 235 240

His Val Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp  
245 250 255

Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu  
260 265 270

Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu  
275 280 285

Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu  
290 295 300

Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser  
305 310 315 320

Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys  
325 330 335

Ala Met Thr Gly Ser Trp Ala Ala Thr Pro Pro Ser Gln Gly Asp Gln  
340 345 350

Val Gln Leu Lys Met Leu Pro Pro Ala Gln  
355 360

<210> 12  
 <211> 2932  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

ctgcagtcag gcggtgaact gacttcatcc caatccctca gccccaccca ggaccagtct      60
ggagtcacctc cctgcccccc attgaaatct ccttccgctc cccaaactta cctctgatct      120
agaccttact cacctccttc ctgtttccta agactccttc ctgccgtcca cagaccgagc      180
cttttatctt tgtccaccct gtgccagaca cctccttttc cagaaccttc tctttactgg      240
tgaccttact tatctctgtt gctttctggg gtcctaggaa atgccagcac tcccaccac      300
attgcctgaa ctttccaaca ctccctagct gcgctgtgtc ctatctcaac acttctcat      360
gtattttctt tgtcttctag aacattcccc cgccattatt acttcaatat ggctacacat      420
acttctaat tgccctgcaa accatctcct tctcaccatt gccagcgat gctttcgtct      480
cctccataaa cactcccgga gaccaatctt tgtgtcagcc ccatactccc tegttagacac      540
actgactcca tacataacct ccttgaaaaa cctctttatt aatctcacca tcttcagac      600
ttccctctg tcataattcc atccctctc caacttttcc ctctcaagct ctgcccttcc      660
cagcccagcc cagcctaccc aacctcatct ctccctgtga gaccacatcc caccatgttc      720
ccttgagcct ccaaggaagg ggctcagggg gcccctggc ctcccgctcc ctgtggcccc      780
acagcccccg tgggccaggg gaagcgcccc agaagccgaa gtgcccacc atg ggc aac      838

```

Met Gly Asn

1

```

cac acg tgg gag ggc tgc cac gtg gac tcg cgc gtg gac cac ctc ttt      886
His Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg Val Asp His Leu Phe
      5              10              15

```

```

ccg cca tcc ctc tac atc ttt gtc atc ggc gtg ggg ctg ccc acc aac      934
Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val Gly Leu Pro Thr Asn
      20              25              30              35

```

```

tgc ctg gct ctg tgg gcg gcc tac cgc cag gtg caa cag cgc aac gag      982
Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val Gln Gln Arg Asn Glu
      40              45              50

```



|   |      |
|---|------|
| ctg ggc gtc tac ctg atg aac ctc agc atc gcc gac ctg ctg tac atc | 1030 |
| Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala Asp Leu Leu Tyr Ile |      |
| 55 60 65  |      |
| tgc acg ctg ccg ctg tgg gtg gac tac ttc ctg cac cac gac aac tgg | 1078 |
| Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu His His Asp Asn Trp |      |
| 70 75 80  |      |
| atc cac ggc ccc ggg tcc tgc aag ctc ttt ggg ttc atc ttc tac acc | 1126 |
| Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly Phe Ile Phe Tyr Thr |      |
| 85 90 95  |      |
| aat atc tac atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc atc tcg gtg gac cgc | 1174 |
| Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys Ile Ser Val Asp Arg |      |
| 100 105 110 115   |      |
| tac ctg gct gtg gcc cac cca ctc cgc ttc gcc cgc ctg cgc cgc gtc | 1222 |
| Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala Arg Leu Arg Arg Val |      |
| 120 125 130   |      |
| aag acc gcc gtg gcc gtg agc tcc gtg gtc tgg gcc acg gag ctg ggc | 1270 |
| Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp Ala Thr Glu Leu Gly |      |
| 135 140 145   |      |
| gcc aac tcg gcg ccc ctg ttc cat gac gag ctc ttc cga gac cgc tac | 1318 |
| Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu Phe Arg Asp Arg Tyr |      |
| 150 155 160   |      |
| aac cac acc ttc tgc ttt gag aag ttc ccc atg gaa ggc tgg gtg gcc | 1366 |
| Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met Glu Gly Trp Val Ala |      |
| 165 170 175   |      |
| tgg atg aac ctc tat cgg gtg ttc gtg ggc ttc ctc ttc ccg tgg gcg | 1414 |
| Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe Leu Phe Pro Trp Ala |      |
| 180 185 190 195   |      |

ctc atg ctg ctg tcg tac cgg ggc atc ctg cgg gcc gtg cgg ggc agc 1462  
 Leu Met Leu Leu Ser Tyr Arg Gly Ile Leu Arg Ala Val Arg Gly Ser  
                     200                    205                    210

gtg tcc acc gag cgc cag gag aag gcc aag atc aag cgg ctg gcc ctc 1510  
 Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Ala Lys Ile Lys Arg Leu Ala Leu  
                     215                    220                    225

agc ctc atc gcc atc gtg ctg gtc tgc ttt gcg ccc tat cac gtg ctc 1558  
 Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala Pro Tyr His Val Leu  
                     230                    235                    240

ttg ctg tcc cgc agc gcc atc tac ctg ggc cgc ccc tgg gac tgc ggc 1606  
 Leu Leu Ser Arg Ser Ala Ile Tyr Leu Gly Arg Pro Trp Asp Cys Gly  
                     245                    250                    255

ttc gag gag cgc gtc ttt tct gca tac cac agc tca ctg gct ttc acc 1654  
 Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser Ser Leu Ala Phe Thr  
 260                    265                    270                    275

agc ctc aac tgt gtg gcg gac ccc atc ctc tac tgc ctg gtc aac gag 1702  
 Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr Cys Leu Val Asn Glu  
                     280                    285                    290

ggc gcc cgc agc gat gtg gcc aag gcc ctg cac aac ctg ctc cgc ttt 1750  
 Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His Asn Leu Leu Arg Phe  
                     295                    300                    305

ctg gcc agc gac aag ccc cag gag atg gcc aat gcc tcg ctc acc ctg 1798  
 Leu Ala Ser Asp Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn Ala Ser Leu Thr Leu  
                     310                    315                    320

gag acc cca ctc acc tcc aag agg aac agc aca gcc aaa gcc atg act 1846  
 Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Asn Ser Thr Ala Lys Ala Met Thr  
                     325                    330                    335

ggc agc tgg gcg gcc act ccg ccc tcc cag ggg gac cag gtg cag ctg 1894  
 Gly Ser Trp Ala Ala Thr Pro Pro Ser Gln Gly Asp Gln Val Gln Leu  
 340 345 350 355

aag atg ctg ccg cca gca caa tga accccgagtg gcacagaatc cccagttttc 1948  
 Lys Met Leu Pro Pro Ala Gln  
 360

ccctctcatc ccacagtccc ttctctcctg gtctgggtgta tgcaaattgt atggaaaaag 2008  
 ggctgtgtta atattcataa gaatacaaga acttaggaag agtgagggtg gtgtgtcact 2068  
 ggtcaacctt tgtgtccca gatcccatca cagtttggcg attgtggagg gcctcctgaa 2128  
 ggaggagatg agtaaata tttttttgga gacagggtct cactgtgttg cccaggctgg 2188  
 agtgcagtag tgcagtcgtg gctcactgca gcctccacct cctgggctct ccagcgatct 2248  
 tcccacatca gcctcccag tagctgggac cacaatgtg agcccacca tgctgggcta 2308  
 atttttgtac tttttgtata aatggagtct cactatgttt cccaggctg atcttgaact 2368  
 cctgggctca agagatcctc ctgccttggc ctcccaaagt gtcagatta gagatgtgag 2428  
 ccgccatgtc tggccagata aattaagtca aacatttgggt ttccagaaaa taaagacaaa 2488  
 tagagaaggt tagatttttt tttttccaac aagtggataa aagtctgtga ctcgggggaa 2548  
 agtggaagga gaaatgcagc cgatatagag tcattatgtt tgcaaagccc ctgggtcatac 2608  
 aggccaggga acataagacc gcaattctaa gtttctagat aaacagcgat ctccaagtca 2668  
 agactgagga tgaagaggga gaatgtcaga actcaagtga agggcaatca gggcagactg 2728  
 cctggaggag tgatgccaga aggtttggga agaaggtgtg ggacaagaag aaagggtatt 2788  
 tattcattca ttcaacagag gtttatgtag ggcactgtgc tgggtggggc tggggacaca 2848  
 acaatgactg aggcagcctg gccttgccct cacagggtct accatacaca agtaaataaa 2908  
 aaatatgtaa tgtttggaa tgct 2932

<210> 13

<211> 365

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 13

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Gly Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg  
 1 5 10 15

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val  
20 25 30

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val  
35 40 45

Arg Gln His Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala  
50 55 60

Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu  
65 70 75 80

His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly  
85 90 95

Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys  
100 105 110

Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala  
115 120 125

Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp  
130 135 140

Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu  
145 150 155 160

Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met  
165 170 175

Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe  
180 185 190

Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg  
195 200 205

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile  
210 215 220

Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala  
225 230 235 240

Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg  
245 250 255

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser  
260 265 270

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr  
275 280 285

Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His  
290 295 300

Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn  
305 310 315 320

Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr  
325 330 335

Gly Lys Ser Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly  
340 345 350

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln  
355 360 365

<210> 14

<211> 1098

<212> DNA

<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 14

atg gac aac agc acg ggc aca ggg gag ggc tgc cat gtg gac tct cga 48  
 Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Gly Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg  
 1 5 10 15

gtg gac cac ctc ttc cca cca tct ctc tac atc ttc gtc atc ggg gtg 96  
 Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val  
 20 25 30

ggg ctg ccc acc aac tgc ctg gcc ctg tgg gca gcc tac cgg cag gtg 144  
 Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val  
 35 40 45

cgc caa cac aat gag ctg ggc gtc tac ctg atg aac ttg agc att gca 192  
 Arg Gln His Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala  
 50 55 60

gac ctg ctg tac atc tgc act ttg ccg ctg tgg gtc gac tac ttc ctc 240  
 Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu  
 65 70 75 80

cac cat gac aac tgg atc cac ggc cct ggc tcc tgc aag ctc ttt ggc 288  
 His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly  
 85 90 95

ttc atc ttc tac agc aac atc tat atc agc atc gcc ttc ctg tgc tgc 336  
 Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys  
 100 105 110

atc tcc gtg gac cgc tac ctg gct gtg gct cat cct ctg cgc ttt gca 384  
 Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala  
 115 120 125

cgc ctg cgc cgg gtc aag aca gca gtg gct gtg agc tct gtg gtc tgg 432  
 Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 130   | 135 | 140 |     |
| gcc acg gag ctg ggc gcc aat tca gca ccg ctc ttc cat gat gag ctg 480 |     |     |     |
| Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu     |     |     |     |
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| ttt cgt gat cgc tac aac cac acc ttc tgc ttt gag aag ttc ccc atg 528 |     |     |     |
| Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met     |     |     |     |
|   | 165 | 170 | 175 |
| gag cgt tgg gtg gcc tgg atg aat ctg tac cgc gtc ttt gtg ggc ttc 576 |     |     |     |
| Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe     |     |     |     |
|   | 180 | 185 | 190 |
| ctc ttc ccc tgg gca ctc atg ttg ctg tgc tac cgt ggc atc ctg agg 624 |     |     |     |
| Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg     |     |     |     |
|   | 195 | 200 | 205 |
| gca gtg cag agc agt gtg tcc acc gag cgc cag gag aaa gtc aag atc 672 |     |     |     |
| Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile     |     |     |     |
| 210   | 215 | 220 |     |
| aaa cgt ctg gcc ctg agc ctc atc gcc att gtg ctg gtg tgc ttt gcg 720 |     |     |     |
| Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala     |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| cct tac cat gct ctc ctg ctg tct cgc agc gcc gtc tac ctg ggc cgg 768 |     |     |     |
| Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg     |     |     |     |
|   | 245 | 250 | 255 |
| ccc tgg gac tgt ggc ttc gag gag cga gtc ttt tct gcc tac cac agc 816 |     |     |     |
| Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser     |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| tcc ctg gcc ttc acc agc ctc aat tgt gtg gct gac ccc atc ctc tac 864 |     |     |     |
| Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr     |     |     |     |

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| 275   | 280 | 285 |      |
| tgc ctg gtc aac gag ggt gcc cgc agt gat gtg gcc aag gcc ctg cac |     |     | 912  |
| Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His |     |     |      |
| 290   | 295 | 300 |      |
|   |     |     |      |
| aac ctc ctc cgc ttc ctg gcc agc aac aag ccc cag gag atg gcc aat |     |     | 960  |
| Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn |     |     |      |
| 305   | 310 | 315 | 320  |
|   |     |     |      |
| gct tcc ctc acc ctg gag aca ccc ttg acc tcc aag agg agc acc acc |     |     | 1008 |
| Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr |     |     |      |
| 325   | 330 | 335 |      |
|   |     |     |      |
| ggc aag tcg tcc ggg gct gtc tgg gca gtg cct ccg act gcc cag ggg |     |     | 1056 |
| Gly Lys Ser Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly |     |     |      |
| 340   | 345 | 350 |      |
|   |     |     |      |
| gac cag gtg cca ctg aag gtg ctg ctg ccc ccg gca cag tga         |     |     | 1098 |
| Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln             |     |     |      |
| 355   | 360 | 365 |      |

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 15

ataagcttgccaccatggacaacagcacgggcac

36

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 33



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

tagcgccgctcactgtgccgggggcagcag

33

<210> 17

<211> 365

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 17

Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg  
1 5 10 15

Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val  
20 25 30

Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val  
35 40 45

Arg Gln Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala  
50 55 60

Asp Leu Leu Tyr Ile Cys Thr Leu Pro Leu Trp Val Asp Tyr Phe Leu  
65 70 75 80

His His Asp Asn Trp Ile His Gly Pro Gly Ser Cys Lys Leu Phe Gly  
85 90 95

Phe Ile Phe Tyr Ser Asn Ile Tyr Ile Ser Ile Ala Phe Leu Cys Cys  
100 105 110

Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Leu Arg Phe Ala  
115 120 125

Arg Leu Arg Arg Val Lys Thr Ala Val Ala Val Ser Ser Val Val Trp  
130 135 140

Ala Thr Glu Leu Gly Ala Asn Ser Ala Pro Leu Phe His Asp Glu Leu  
145 150 155 160

Phe Arg Asp Arg Tyr Asn His Thr Phe Cys Phe Glu Lys Phe Pro Met  
165 170 175

Glu Arg Trp Val Ala Trp Met Asn Leu Tyr Arg Val Phe Val Gly Phe  
180 185 190

Leu Phe Pro Trp Ala Leu Met Leu Leu Cys Tyr Arg Gly Ile Leu Arg  
195 200 205

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile  
210 215 220

Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala  
225 230 235 240

Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg  
245 250 255

Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser  
260 265 270

Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr  
275 280 285

Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His  
290 295 300

Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn  
 305 310 315 320

Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr  
 325 330 335

Gly Lys Thr Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly  
 340 345 350

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln  
 355 360 365

<210> 18

<211> 1098

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

atg gac aac agc acg ggc acg tgg gag ggc tgc cat gtg gac tct cga 48  
 Met Asp Asn Ser Thr Gly Thr Trp Glu Gly Cys His Val Asp Ser Arg  
 1 5 10 15

gtg gac cac ctc ttc cca cca tcc ctc tac atc ttc gtc atc ggg gtg 96  
 Val Asp His Leu Phe Pro Pro Ser Leu Tyr Ile Phe Val Ile Gly Val  
 20 25 30

ggg ctg ccc acc aac tgc ctg gcc ctg tgg gca gcc tac cgc cag gtg 144  
 Gly Leu Pro Thr Asn Cys Leu Ala Leu Trp Ala Ala Tyr Arg Gln Val  
 35 40 45

cgc cag cgc aat gag ctg ggc gtc tac ctg atg aac ttg agc atc gca 192  
 Arg Gln Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Met Asn Leu Ser Ile Ala  
 50 55 60

gac ctg ctg tac atc tgt acg ctg ccg ctg tgg gtc gac tac ttc ctc 240

19/21

Ala Val Gln Ser Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Glu Lys Val Lys Ile  
 210 215 220

aaa cgc ctg gcc ctg agc ctc atc gcc atc gtg ctg gtg tgc ttt gca 720  
 Lys Arg Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ile Val Leu Val Cys Phe Ala  
 225 230 235 240

ccc tac cat gct ctc ttg ctg tct cgc agc gct gtc tat ctg ggc cgg 768  
 Pro Tyr His Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ser Ala Val Tyr Leu Gly Arg  
 245 250 255

ccc tgg gac tgt ggc ttc gag gag cga gtc ttc tct gcc tac cac agc 816  
 Pro Trp Asp Cys Gly Phe Glu Glu Arg Val Phe Ser Ala Tyr His Ser  
 260 265 270

tcc cta gcc ttc acc agc ctc aat tgc gtg gct gac ccc atc ctc tac 864  
 Ser Leu Ala Phe Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile Leu Tyr  
 275 280 285

tgc ctg gtc aac gag ggt gcc cgt agt gac gtg gcc aaa gcc ctg cac 912  
 Cys Leu Val Asn Glu Gly Ala Arg Ser Asp Val Ala Lys Ala Leu His  
 290 295 300

aac ctc ctc cgc ttc ctg gcc agc aac aag ccc cag gag atg gcc aat 960  
 Asn Leu Leu Arg Phe Leu Ala Ser Asn Lys Pro Gln Glu Met Ala Asn  
 305 310 315 320

gct tcc ctc acc ctg gag aca cca ttg acc tcc aag agg agc acc acc 1008  
 Ala Ser Leu Thr Leu Glu Thr Pro Leu Thr Ser Lys Arg Ser Thr Thr  
 325 330 335

ggc aaa acg tct ggg gct gtc tgg gca gtg cct ccc act gcc cag ggg 1056  
 Gly Lys Thr Ser Gly Ala Val Trp Ala Val Pro Pro Thr Ala Gln Gly  
 340 345 350

gac cag gtg cca ctg aag gtg ctg ctg ccc ccg gca cag tga 1098

Asp Gln Val Pro Leu Lys Val Leu Leu Pro Pro Ala Gln  
355 360 365

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

tgtccaccgagcgccaggag

20

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

cattggccatctcctgggg

19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB03/03475

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/519, 31/55, 31/7088, 39/395, 48/00,  
A61P17/04, 43/00, C07D401/14, 403/06, 417/14, 471/14,  
519/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00-45/08, 31/00-31/80, 48/00, A61P1/00-43/00,  
C07D401/00-401/14, 403/00-403/06, 417/00-417/14,  
471/00-471/14, 519/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBASE (STN),  
BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS),  
DDBJ/GanBank/EMBL, SwissProt/PIR/PDB, GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.     |
|-----------|---|---------------------------|
| Y         | WO 02/24222 A2 (THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION),<br>28 March, 2002 (28.03.02),<br>Claims; examples<br>& AU 200192867 A & US 2002/0107197 A1  | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |
| Y         | BEERS, M.H. et al., (ed.) THE MERCK MANUAL OF<br>DIAGNOSIS AND THERAPY., 17th Edition., 1999,<br>ISBN 0911910-10-7, ISSN 0076-6526, pages 786<br>to 793; particularly, page ATOPIC DERMATITIS | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |
| Y         | WO 02/061087 A2 (LIFESPAN BIOSCIENCES, INC.),<br>08 August, 2002 (08.08.02),<br>Claims; [265] to [266]; sequence Nos. 272, 273<br>(Family: none)  | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
11 December, 2003 (11.12.03)

Date of mailing of the international search report  
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB03/03475

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
|-----------|---|------------------------|
| Y         | HEIBER, M. et al., Isolation of Three Novel Human Encoding G Protein-Coupled Receptors., DNA Cell Biol., 1995, 14(1), pages 25 to 35                            | 1-3,12,15,<br>16,20-22 |
| Y         | MAHADEVAN, M.S. et al., Isolation of a Novel G Protein-Coupled Receptor(GPR4) Localized to Chromosome 19q13.3. Genomics, 1995, 30, pages 84 to 88               | 1-3,12,15,<br>16,20-22 |
| A         | EP 549352 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.),<br>30 June, 1993 (30.06.93),<br>& JP 6-228065 A & US 5378701 A<br>& US 5478840 A & US 5607955 A                     | 4-11,14-16             |
| A         | EP 325755 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.),<br>02 August, 1989 (02.08.89),<br>& JP 1-308274 A & AU 8826711 A<br>& US 4994463 A & US 5143922 A<br>& US 5302602 A | 4-11,14-16             |
| A         | JP 9-40662 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.),<br>10 February, 1997 (10.02.97),<br>(Family: none)  | 4-11,14-16             |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03475

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13, 17-19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 13 and 17 to 19 pertain to methods for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i), PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical matter common to claims 1-3 and 12, parts of claims 15 and 16 referring to claims 1-3, and claims 20-22 is prevention and/or treatment of itch by using the active ingredient a substance capable of suppressing the signal-transducing functions of a protein having an amino acid sequence set forth in sequence number 11, while that common to claims 4-11 and 14, and parts of claims 15 and 16 referring to claim 10 is compounds represented by the general formula (I) in themselves.

Therefore, there is no technical matter common to both groups which is considered as a special technical feature, and the two groups of inventions  
(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No.

PCT/IB03/03475

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K45/00, 31/519, 31/55, 31/7088, 39/395, 48/00, A61P17/04, 43/00,  
C07D401/14, 403/06, 417/14, 471/14, 519/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K45/00-45/08, 31/00-31/80, 48/00, A61P1/00-43/00,  
C07D401/00-401/14, 403/00-403/06, 417/00-417/14, 471/00-471/14, 519/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN),  
JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS), DDBJ/GanBank/EMBL, SwissProt/PIR/PDB, GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号          |
|-----------------|--|---------------------------|
| Y               | WO 02/24222 A2 (THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION)<br>2002. 03. 28, 請求の範囲, 実施例,<br>& AU 200192867 A & US 2002/0107197 A1   | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |
| Y               | BEERS, M. H., <i>et al.</i> (ed.) THE MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS<br>AND THERAPY. 17th Edition. 1999, ISBN 0911910-10-7,<br>ISSN 0076-6526, pp. 786-793, 特にATOPIC DERMATITISの項 | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |
| Y               | WO 02/061087 A2 (LIFESPAN BIOSCIENCES, INC.) 2002. 08. 08,<br>請求の範囲, [265]-[266], 配列番号272, 273   | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 1 2 . 0 3

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒 木 英 則



4 C

9 7 3 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |   |                           |
|-----------------------|---|---------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号          |
|                       | (ファミリーなし)   |                           |
| Y                     | HEIBER, M., <i>et al.</i> Isolation of Three Novel Human Encoding G Protein-Coupled Receptors. DNA Cell Biol., 1995, 14(1), pp. 25-35                 | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |
| Y                     | MAHADEVAN, M. S., <i>et al.</i> Isolation of a Novel G Protein-Coupled Receptor (GPR4) Localized to Chromosome 19q13.3. Genomics, 1995, 30, pp. 84-88 | 1-3, 12, 15,<br>16, 20-22 |
| A                     | EP 549352 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1993. 06. 30,<br>& JP 6-228065 A & US 5378701 A & US 5478840 A & US 5607955 A                              | 4-11, 14-16               |
| A                     | EP 325755 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1989. 08. 02,<br>& JP 1-308274 A & AU 8826711 A & US 4994463 A & US 5143922 A<br>& US 5302602 A            | 4-11, 14-16               |
| A                     | JP 9-40662 A (協和醗酵工業株式会社) 1997. 02. 10<br>(ファミリーなし)   | 4-11, 14-16               |

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

PCT17条(2)(a)の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13, 17-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲13、17-19に係る発明は治療による人体の処置方法に関するものである。(PCT17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-3、12、15および16のうち1-3を引用する部分、並びに20-22に係る発明に共通の技術的事項は、配列番号11記載のアミノ酸配列を有する蛋白質のシグナル伝達に関する機能を抑制する物質を有効成分として含有して掻痒を予防および/または治療することにあるものと認められる。一方、請求の範囲4-11、14、並びに、15および16のうち10を引用する部分に係る発明に共通の技術的事項は、式(I)で表される化合物自体にあるものと認められる。

してみれば、両者に共通する、特別の技術的特徴となり得る技術的事項は存在せず、両者が単一の一般的発明概念を形成するように関連したものであるということとはできない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。